

**SILVILENA BONATTI**

**TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE (808 nm)  
EM BAIXA E ALTA DOSAGEM NA CICATRIZAÇÃO  
DE FERIDA INCISIONAL EM PELE DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências**

**SÃO PAULO**

**2013**

**SILVILENA BONATTI**

**TERAPIA A *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE (808nm)  
EM BAIXA E ALTA DOSAGEM NA CICATRIZAÇÃO  
DE FERIDA INCISIONAL EM PELE DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências**

**ORIENTADOR: Prof. BERNARDO HOCHMAN  
CO-ORIENTADORES: Prof. RICHARD LIÉBANO  
Prof. Dr. NIVALDO PARIZOTTO**

**SÃO PAULO**

**2013**

Bonatti, Silvilena.

**Terapia a LASER de baixa intensidade (808 nm) em baixa e alta dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos.**/ Silvilena Bonatti. -- São Paulo, 2013.

XXI, 102f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Low-level laser therapy (808 nm) in incisional wound healing in rat skin.

1. Cicatrização. 2. Terapia a Laser. 3. Lasers. 4. Pele. 5. Ratos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
TRANSLACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

*A Deus, que em seu infinito amor, me sustentou e guiou cada passo meu para realização deste trabalho! Que colocou as pessoas certas no momento certo para colaborarem e me apoiarem durante essa jornada!*

*“Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste de lamento em veste de alegria, para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale. Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.”  
(Salmos 30:11-12)*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Guerino Bonatti e Nilce Fantim Bonatti, presentes de Deus em meu caminho, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigada. A eles, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperanças, não bastaria um muito obrigada. A eles, que se doaram por completo e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante meus períodos de ausência, não bastaria um muitíssimo obrigada. A eles, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para lhes agradecer. Mas é o que me ocorre agora, quando procuro arduamente uma forma verbal para expressar uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida em palavras!*

## DEDICATÓRIA

*À querida e amada Sônia Flora Bonatti  
muito mais que cunhada, minha “irmã  
mais velha” que sempre me apoiou e  
torceu por mim, mesmo de longe,  
expressando todo seu carinho.*

*Ao meu irmão Adilson Ap. Bonatti,  
exemplo de profissionalismo e  
competência.*

*Ao meu sobrinho Jonhatah R. Bonatti  
pelo carinho e alegria que sempre me  
proporcionou!*

## DEDICATÓRIA

*À minha querida e amada amiga Tatiana Varandas, que sempre esteve ao meu lado me dando incentivo e me distraíndo nas horas de diversão; por enxergar em mim uma pessoa muito melhor do que sou!*

*À minha querida e amada amiga Ivone Orrutia, sempre presente, mesmo que a distância, expressando todo seu carinho, solidariedade e otimismo!*

*À minha querida e amada amiga Cibele Moraes, sempre sorrindo e me contagiando com sua amizade, carinho, alegria e compreensão.*

*À querida Geni Sousa, minha amiga e coach, que me acompanhou em todas as etapas deste trabalho, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional e pessoal; incentivando meus objetivos e acreditando em mim!*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. **BERNARDO HOCHMAN**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica, Orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp e orientador deste trabalho, por transmitir seu conhecimento com tamanha motivação e desprendimento, encantando cada aluno que passa por seu caminho. Pelas oportunidades que proporcionou, por me ensinar o que é a pesquisa e que ser um pesquisador vai muito além da importante busca de conhecimento, realização de experimentos e conquista de títulos! Pela convivência durante todos esses anos demonstrando sua preocupação com os pacientes do Ambulatório de Cicatrizes Patológicas, pelos quais luta arduamente em busca da cura das cicatrizes fibroproliferativas. Manifesto aqui toda minha gratidão, admiração e carinho pelo exímio professor, pesquisador, médico e pela pessoa especial que se expressa!

Ao Prof. Dr. **RICHARD LIEBANO**, Professor do Programa de Mestrado em Fisioterapia da Universidade de São Paulo (Unicid), Professor Coorientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp e coorientador deste estudo, pela disponibilidade todas as vezes que precisei, pela paciência, compreensão e por compartilhar o seu conhecimento, que levarei sempre comigo com muito orgulho de ter

sido sua aluna!

Ao Prof. Dr. **NIVALDO PARIZOTTO**, Professor Titular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e coorientador deste estudo, por estar sempre presente mesmo não estando em São Paulo ou no Brasil, por aceitar fazer parte deste projeto e transmitir o seu conhecimento e experiência de forma tão sábia e humilde! Expresso aqui toda minha gratidão e admiração pelo professor, pesquisador e pessoa íntegra que é!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **FABIANNE FURTADO**, Professora do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Barbacena, Professora Coorientadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp e amiga, que participou deste estudo desde o início e colaborou na orientação, sempre solícita, sincera, aberta e ótima conselheira. Agradeço por fazer parte deste estudo e pelas importantes contribuições.

Ao Prof. Dr. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, Professor Adjunto do Curso de Fisioterapia da Unifesp Campus Baixada Santista e Professor Coorientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, pela oportunidade de conviver em outros trabalhos dos grupos de pesquisa dele e do Prof. Bernardo Hochman, pelos ensinamentos na área de fototerapia, pelas contribuições e críticas ao presente estudo, e ainda, pelo exemplo que é à classe dos fisioterapeutas como excelente pesquisador e

professor.

À **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, aluna do curso de Pesquisa em Cirurgia da Unifesp e amiga que admiro muito, que me acompanhou por horas no laboratório participando dos experimentos, dando conselhos, revisando a tese, treinando comigo cada apresentação. Agradeço toda amizade, paciência e solidariedade.

Ao Prof. Dr. **MAURO CANZIAN**, Médico Assistente do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP) e Patologista, por toda colaboração, empenho e aprendizado concedido na análise das lâminas. Sou muito grata pela disponibilidade e paciência durante a fase de análise e interpretação de resultados deste estudo.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Translacional da Unifesp, **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela imensa dedicação, carinho e respeito e por toda a ajuda durante minha estada no Aperfeiçoamento e Mestrado em Cirurgia Translacional da Unifesp.

À **ARAINY SUÉLY ANTUNES** e à **PAOLA MONTEIRO**, alunas de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional e amigas, pela ajuda nos experimentos, pelo apoio na elaboração da tese,

pelo carinho e pelos momentos de alegria!

À **VIVIANE NASCIMENTO**, minha amiga-irmã e companheira do dia a dia, que acompanhou cada passo da realização deste projeto, inclusive no laboratório durante a fase de coleta de dados - sempre disposta a me ouvir, discutir meu trabalho e assistir às inúmeras apresentações!

À **ERIKA RAMPAZO** e à **ROBERTA FOLHA**, alunas de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional e amigas, pela ajuda e companheirismo durante a fase de análise de birrefringência de fibras colágenas.

À **GRAZIELA CHACON BORBA**, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp e amiga, pela ajuda na análise de imuno-histoquímica, pela prestatividade, amizade e palavras de incentivo.

À **ANGELA FERREIRA**, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp e amiga muito querida, pelas dicas com relação à estrutura da dissertação, por assistir várias apresentações e por todo apoio, amizade e carinho durante todas as etapas!

Ao **MÁRCIO CHAVES**, Biólogo e Técnico do Laboratório de Genética do InCor, pelas horas pacientemente dispendidas em padronizar as reações de imuno-histoquímica e fazê-las de modo tão competente.

Ao **MARCO AURÉLIO NEVES**, Mestre pelo Programa de Pós-

Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, pela ajuda nas etapas iniciais do projeto e no aprendizado dos procedimentos com os animais utilizados neste estudo.

A todos os **AMIGOS** e **AMIGAS** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, pela colaboração e críticas sobre o conteúdo e formatação da tese.

A todos os **PROFESSORES ORIENTADORES** e **COLABORADORES** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, pelas críticas sempre construtivas que ajudaram na melhora e finalização deste estudo, tendo sido fundamentais para realização desta etapa.

*Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.*

Clive Staples Lewis (1898 – 1963)

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XXI</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.OBJETIVO .....</b>	<b>5</b>
<b>3.LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>4.MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>8.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>74</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
<b>FONTES CONSULTADAS .....</b>	<b>102</b>

## Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da distribuição dos grupos e subgrupos simulados e experimentais. GS: Grupo Simulado; GB: Grupo Experimental Baixa Energia (1,5 J); GA: Grupo Experimental Alta Energia (60 J)	23
Figura 2 – Epilação	24
Figura 2A – Demarcação com gabarito de acetato da área a ser epilada	24
Figura 2B – Região dorsal do animal após epilação digital	24
Figura 3 – Incisão cirúrgica e sutura	25
Figura 3A – Demarcação no dorso do animal com gabarito de acetato e caneta dermográfica da incisão com 3 cm e dos pontos de sutura equidistantes 1 cm entre si e a partir das extremidades	25
Figura 3B – Pele incisada	25
Figura 3C – Pontos de sutura equidistantes 1 cm	25
Figura 4 – Preparo para irradiação	26
Figura 4A – Gabarito de acetato com 3 pontos equidistantes 1 cm para aplicação de <i>laser</i>	26
Figura 4B – Gabarito posicionado no dorso do animal	26
Figura 5 – Aplicação de LLLT mediante uso de gabarito de acetato e com auxílio de suporte para apoio da caneta de <i>laser</i>	27



Figura 6 – Parâmetros utilizados em cada grupo para irradiação por ponto. E: energia total; DE: densidade de energia; t: tempo; GC: grupo controle; GB: grupo experimental baixa dose; GA: grupo experimental alta dose	28
Figura 7 – Preparo para coleta de tecido	30
Figura 7A – Gabarito de acetato para demarcação da área de tecido a ser coletada para análise	30
Figura 7B – Gabarito de acetato posicionado para delimitar a área de coleta de tecido cicatricial e pele adjacente	30
Figura 8 – Amostra coletada	31
Figura 8A – Amostra fixa com alfinete colorido e mantida em formol tamponado 10 % logo após retirada	31
Figura 8B – Cassete histológico identificado com número do animal e dia de coleta para alojar a amostra coletada	31
Figura 8C – Frasco contendo formol tamponado a 10 % para armazenamento das amostras	31

## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Análise de fibroblastos pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta .....	38
Tabela 2.	Análise de vasos pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.....	38
Tabela 3.	Análise de tecido de granulação pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.....	38
Tabela 4.	Comparação das variáveis analisadas através da coloração de hematoxilina-eosina entre os dias de coleta.....	39
Tabela 5.	Análise de infiltrado inflamatório pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.....	40
Tabela 6.	Descrição dos percentuais de área de colágeno tipo I e tipo III no 7º dia.....	40
Tabela 7.	Descrição dos percentuais de área de colágeno tipo I e tipo III no 14º dia.....	41
Tabela 8.	Comparações das médias de colágeno tipo I e tipo II segundo grupos e dias de coleta.....	41
Tabela 9.	Comparações dos percentuais de área de colágeno tipo I entre os grupos ou dias de coleta.....	42
Tabela 10.	Comparações dos percentuais de área de colágeno tipo III entre os grupos ou dias de coleta.....	43
Tabela 11.	Descrição das médias de retardo óptico segundo grupos com amostras coletadas no 7º dia.....	43
Tabela 12.	Descrição das médias de retardo óptico segundo grupos com amostras coletadas no 14º dia.....	44
Tabela 13.	Resultado das comparações entre os grupos para as médias de retardo óptico	45

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AlGaInP	Alumínio gálio índio fósforo
Anova	Análise de variância
AsGaAl	Arseneto de gálio e alumínio
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> - Fator básico de Crescimento de Fibroblastos
°C	Graus Celsius
Cedeme	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
$\lambda$	Comprimento de onda
DAB	Diaminobenzina
DE	Densidade de energia
DP	Densidade de potência
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
E	Energia total
EPM	Escola Paulista de Medicina
<i>et al.</i>	E colaboradores
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
GaAlAs	Gálio alumínio arsenieto
G	Gramas
°	Graus
GA	Grupo alta dose

GB	Grupo baixa dose
GS	Grupo simulado
GA7	Subgrupo alta dose 7 dias
GA14	Subgrupo alta dose 14 dias
GB7	Subgrupo baixa dose 7 dias
GB14	Subgrupo baixa dose 14 dias
HE	Hematoxilina-Eosina
HeNe	Hélio-Neônio
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
J	Joules
Kg	Quilograma
Incor	Instituto do Coração, FMUSP
LLLT	<i>Low Level Laser Therapy</i> – Terapia a Laser de Baixa Intensidade
Lamav	Laboratório de Materiais Vítreos, UFSCar
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LED	<i>Light Emitting Diode</i> - Diodo Emissor de Luz
MEC	Matriz extracelular
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma de massa corporal
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
MII	Morte induzida indolor

N	Número da amostra total
n	Número da amostra por grupo
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
P	Potência útil
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Salina Tamponada com Fosfato
PO	Pós-operatório
R	Rato
RO	Retardo óptico
s	Segundo
SFB	Soro Fetal Bovino
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
Unifesp	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
WALT	<i>World Association of Laser Therapy</i>
W	Watt

## RESUMO

**Introdução:** O laser de baixa intensidade (LLLT) é um recurso utilizado para modulação do processo de cicatrização, sobretudo nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho. Estudos *in vitro* com altas doses de energia promovem aumento da apoptose em fibroblastos, redução da proliferação e metabolismo celular. Há escassez de estudos *in vivo* com altas dosagens de energia no processo cicatricial. **Objetivo:** Investigar a ação da terapia a laser de baixa intensidade (808 nm) em alta e baixa dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 60 ratos Wistar-EPM machos de 8 semanas, distribuídos em 3 grupos (GS: simulado; GB: 1,5 J; GA: 60 J) e subdivididos em 2 subgrupos em função do dia de coleta das amostras (7 dias: GS7, GB7, GA7; 14 dias: GS14, GB14, GA14). Foi realizada incisão no dorso dos ratos, que foi irradiada com *laser* infravermelho (808 nm) por 5 dias consecutivos. As amostras de tecido cicatricial foram submetidas a preparo histológico para coloração de hematoxilina e eosina, imunohistoquímica de colágeno I e III e birrefringência de fibras colágenas. **Resultados:** O retardo óptico (RO) foi maior nos grupos GB e GA independentemente do dia de coleta em relação ao grupo GS ( $p < 0,001$ ). A quantidade de fibroblastos ( $p < 0,001$ ), vasos ( $p < 0,021$ ) e tecido de granulação ( $p < 0,010$ ) foi reduzida nos grupos com amostra coletada no 14º dia em relação aos grupos com amostra coletada no 7º dia. A quantidade de colágeno tipo I reduziu em todos os grupos independente do dia de coleta ( $p < 0,001$ ). A quantidade de colágeno tipo III reduziu no 14º dia no GA ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** A LLLT nas doses de 1,5 e 60 J reduziu fibroblastos, vasos e tecido de granulação no 14º dia.; aumentou o RO da cicatriz e pele adjacente; reduziu quantidade de colágeno tipo I. O colágeno tipo III reduziu no 14º dia com a dose de 60 J.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que interagem entre si para que ocorra a reparação tecidual (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003; EMING, KRIEG, DAVIDSON, 2007; GURTNER *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009). Qualquer desequilíbrio nessa cascata de eventos pode acarretar tanto um retardo da cicatrização levando, por exemplo, à formação de úlceras (KAVROS, MILLER, HANNA, 2007; BRANDI *et al.*, 2010) quanto sua exacerbação, resultando em cicatrizes fibroproliferativas (HOCHMAN *et al.*, 2005; ROBLES & BERG, 2007; KÖSE & WASEEN, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010).

Existem diversos recursos biofísicos utilizados para modular o processo de cicatrização de forma dose-dependente. Na literatura, são bem descritos os efeitos estimulatórios da eletroterapia, ultrassom (ENNIS *et al.*, 2006) e terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, *Low Level Laser Therapy*) (CORAZZA *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2007; BRANDI *et al.*, 2010). Por outro lado, há escassez de estudos em relação aos efeitos inibitórios, o que seria de grande valia no tratamento das cicatrizes fibroproliferativas (HOCHMAN *et al.*, 2013). Nesse sentido, BORBA *et al.* (2009) estudaram a ação da eletroterapia em cicatrização de feridas incisionais em ratos. Estudos *in vitro* com fototerapia de baixa intensidade relatam a inibição do metabolismo celular e apoptose (SHU *et al.*, 2002; WEBB & DYSON, 2003; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; LEV-TOV *et al.*, 2013-a; LEV-TOV *et al.*, 2013-b).

A LLLT é uma modalidade da fototerapia que vem sendo objeto de estudo no processo de reparo tecidual devido ao seu caráter biomodulador, com atuação central no metabolismo mitocondrial (KARU *et al.*, 2005). Os



comprimentos de onda entre 660 nm e 950 nm são frequentemente utilizados em pesquisas que visam avaliar os efeitos estimulatórios sobre a cicatrização cutânea (BONATTI *et al.*, 2011), sobretudo no que se refere à síntese de colágeno (REZENDE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007), proliferação de fibroblastos (WEBB & DYSON, 2003; VINCK *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2005; LEV-TOV *et al.*, 2013a) e angiogênese (SCHINDL, *et al.*, 2003; KANDOLF-SEKULOVIC, KATARANOVSKI, PAVLOVIC, 2003; PINFILDI *et al.*, 2005; CORAZZA *et al.*, 2007).

Nesse sentido, a LLLT dentro do espectro vermelho (630 a 690 nm) tem sido a mais estudada, seguida pelo infravermelho (780 a 980 nm). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o espectro vermelho em doses de energia entre 0,3 e 1,5 J, promove aumento na proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno (BEDNARSKA *et al.*, 1998; WEBB *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 2005; HAWKINS & ABRHAMSE, 2006; CORAZZA *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Em contrapartida, outros estudos *in vitro* demonstram a redução da proliferação de fibroblastos com comprimento de onda vermelho quando utilizadas altas doses de energia (SHU *et al.*, 2002; LEV-TOV *et al.*, 2013b).

Embora os efeitos do espectro infravermelho na diminuição da resposta celular estejam bem elucidados com relação à proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de matriz extracelular quando utilizadas doses de energia mais altas (entre 18 e 145 J), esses relatos provêm apenas de estudos *in vitro* (WEBB *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2005; HAWKINS & ABRHAMSE, 2006; LEV-TOV *et al.*, 2013).

Assim, verifica-se que a LLLT exerce um efeito dose-dependente sobre o metabolismo celular, sendo que doses de energia mais baixas geram um aumento da resposta, ao passo que doses mais elevadas promovem redução ou inibição. Os estudos que relataram esses efeitos inibitórios

relacionam sua aplicabilidade clínica, como no tratamento de cicatrizes fibroproliferativas (WEBB *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2005; LEV-TOV *et al.*, 2013). Contudo, não foram encontrados estudos especificamente direcionados à verificação do efeito inibitório da LLLT com altas doses de energia comparadas a doses menores, na cicatrização *in vivo*.

Também são pouco estudados o alinhamento e a disposição espacial de fibras colágenas em feridas incisionais na pele, o que seria de grande relevância clínica, pois quanto mais alinhadas essas fibras, melhor a qualidade e o aspecto da cicatriz (BERRY *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2006). A maioria dos estudos avalia os colágenos tipo I e tipo III e o seu alinhamento em estruturas como ligamentos e tendões (PUGLIESE *et al.*, 2003; WOOD *et al.*, 2010). Entretanto SILVA *et al.* (2006), estudando pele de ratos queimados, analisaram por birrefringência o alinhamento das fibras de colágeno após irradiação com laser de He-Ne e constatou que houve maior valor de retardo óptico, portanto um melhor alinhamento das fibras de colágeno.

Não há estudos *in vivo* especificamente direcionados à comparação do efeito do laser infravermelho em baixas ou altas doses de energia no alinhamento ou na quantidade das fibras de colágeno da pele, no processo de cicatrização, embora a disposição e a quantidade dessas fibras denote a qualidade e o aspecto da cicatriz.

## **OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Investigar a ação da terapia a Laser de baixa intensidade (808nm) em baixa e alta dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos.

## **LITERATURA**

### 3. LITERATURA

#### 3.1 Laser Vermelho

##### 3.1.1 Estudos *in vitro*

WEBB, DYSON, LEWIS (1998) investigaram o efeito da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, *Low Level laser Therapy*) de 660 nm em fibroblastos de cicatrizes hipertróficas e de pele. As amostras foram obtidas a partir de biópsias de cicatrizes hipertróficas e pele adjacente de mulheres chinesas de 20 anos de idade submetidas a cirurgias de correção de cicatriz nas regiões de ombro e pescoço. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Meio de Eagle modificado por Dulbecco) e lavadas em solução salina (PBS - *Phosphate Buffered Saline*), sendo armazenadas em frascos de cultura e permanecendo em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após confluência de 80 %, os fibroblastos foram caracterizados por imuno-histoquímica para excluir outros tipos celulares e assegurar a homogeneidade das amostras. Em seguida, as células derivadas de cicatrizes hipertróficas e de pele foram distribuídas em grupos (de acordo com as doses de energia): *sham*, 2,4 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>; e subgrupos (de acordo com os dias de contagem): 1, 2, 3, 4 e 5. Os parâmetros utilizados para irradiação foram potência (P) de 17 mW; área de secção transversa do feixe de 0,217 cm<sup>2</sup>; densidade de potência (DP) de 0,078 W/cm<sup>2</sup> e densidades de energia (DE) de 2,4 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>, correspondendo a tempos de 31 s e 54 s e energia (E) de 0,53 J e 0,92 J respectivamente. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar, onde as células foram mantidas em poços e suspensas em 100 µl de meio de cultura. Durante a irradiação, a ponteira do equipamento permaneceu perpendicular ao poço e a 0,6 cm de distância deste. Após a irradiação, os poços foram preenchidos com meio de cultura e levados para a estufa. A contagem celular foi realizada 24 h após a irradiação e sucessivamente (48, 72 e 96 h) nos outros grupos. Para essa etapa, os fibroblastos foram corados com

azul de metileno e a contagem celular realizada em espectrofotômetro de 650 nm. Nos dias 1 a 4, na dose de 0,53 J, o número de células de cicatriz hipertrófica foi muito maior que nos respectivos controles, com diferenças entre 8,2 e 12 % ( $p < 0,01$ ). A contagem de fibroblastos de pele com essa mesma dose foi muito maior nos dias 1 a 3 (diferenças entre 7,7 e 12,8 %), em relação aos respectivos controles ( $p < 0,01$ ). Com relação à energia de 0,92 J, houve uma diferença entre 8,9 e 20,8 % entre as células de cicatriz hipertrófica irradiadas e não irradiadas, nos dias 1 a 4. A quantidade de células de pele também aumentou nas contagens realizadas nos dias 1 a 3, com diferenças de 7,1 a 10,2 %. Os autores concluíram que o LLLT de 660 nm teve um efeito estimulatório em fibroblastos de pele e de cicatriz hipertrófica com ambas as doses, sendo inapropriado para o tratamento de cicatrizes hipertróficas.

SHU *et al.* (2002) verificaram o efeito inibitório do *laser* de He-Ne (Hélio-Neônio) de 632,8 nm em cultura de fibroblastos de cicatrizes hipertróficas. As células foram obtidas de 5 pacientes (3 homens e 2 mulheres) com idade entre 14 e 38 anos, portadores de cicatrizes hipertróficas com tempo de 8 a 24 meses. A cultura dos fibroblastos foi realizada em placas de cultura, com DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). Após 5 dias houve confluência das células (85 %), que foram então divididas em dois grupos: controle (sem irradiação) e experimental (recebeu irradiação com *laser* He-Ne, com potência de 50 mW, área de secção transversa do feixe de  $0,32 \text{ cm}^2$ , densidade de potência (DP) de  $50 \text{ mW/cm}^2$  e tempos de 60 s, 600 s, 1800 s e 3600 s, com energia total de 3 J, 30 J, 90 J e 180 J respectivamente; esse grupo foi subdividido de acordo com as doses de energia referidas. A contagem foi realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 9 após a irradiação. A contagem das células foi efetuada em triplicata (considerando-se

a média), utilizando-se corante *trypan blue*, nos mesmos dias adotados na primeira etapa. Também foi realizada citometria de fluxo para complementar a contagem. Os autores constataram que aplicações repetidas (3 a 5 vezes) com a DE de  $180 \text{ J/cm}^2$  resultaram em diminuição do número total de fibroblastos, em comparação aos respectivos controles.

### 3.1.2 Estudos *in vivo*

GAL *et al.* (2006), em estudo autocontrolado e randomizado, avaliaram a influência do *laser* diodo de 670 nm na cicatrização de feridas incisionais cutâneas, abrangendo epiderme, derme e músculo estriado, em ratos. Foram utilizados 49 ratos machos *Sprague-Dawley* com 450 a 550 g e idade entre 6 e 8 meses. Os animais foram distribuídos em 7 grupos com 7 ratos cada, em função do período de coleta das amostras para análise histológica: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120h, 144 h e 168 h. Para realização das feridas, os animais foram anestesiados com quetamina (40 mg/kg), xilazina (15 mg/kg) e tramadol (5 mg/kg). Em seguida, foram realizadas duas incisões paralelas de 3 cm de comprimento no dorso dos ratos, em sentido longitudinal e craniocaudal, com distância de 4 cm entre elas. As feridas foram suturadas com fio chirafilon 3-0. A incisão do lado esquerdo foi eleita como experimental e a do lado direito, como controle. Para irradiação foi utilizado equipamento de diodo *laser* de 670 nm, com densidade de potência de  $25 \text{ mW/cm}^2$ , potência de 10 mW, área de secção transversa de feixe de  $0,4 \text{ cm}^2$ , densidade de energia de  $30 \text{ J/cm}^2$  e tempo de 480 s, com energia de 4,8 J por ponto. Durante o procedimento, o lado direito foi protegido para refletir a luz do *laser*, enquanto a área de aplicação foi dividida em 3 partes e irradiada pontualmente. Decorridos os intervalos de tempos adotados, foram



realizadas as coletas de amostras (2 de cada animal, 14 de cada grupo). As amostras foram devidamente fixadas em parafina e coradas para análise histológica com hematoxilina-eosina (coloração básica), van Gieson (fibras colágenas), ácido periódico Schiff + ácido periódico Schiff diástase (matriz extracelular), fosfotúngstico-hematoxilina de Mallory (fibrina) e azur e eosina (eritrócitos, visualização de vasos). Os resultados da comparação de feridas irradiadas com as não irradiadas (controle) demonstraram que a aplicação do *laser* reduziu o período da fase inflamatória assim como acelerou a fase proliferativa e de maturação; além disso, a epitelização e a reparação da musculatura estriada foram estimuladas. Como conclusão, a LLLT de 670 nm influenciou positivamente todas as fases da cicatrização.

YASUKAWA *et al.* (2007) investigaram o efeito do *laser* He-Ne em cicatrização de incisão cirúrgica em pele de ratos. Foram utilizados 55 animais (*Sprague Dawley*) machos, com idade de 8 semanas e massa corporal entre 238 e 330 g. Os ratos foram anestesiados e foram realizadas 3 incisões de 1 cm no dorso, abrangendo pele e panículo carnosos até a fáscia muscular, em região torácica a partir do nível do ângulo inferior das escápulas em sentido caudal. As suturas foram realizadas com fio de mononylon 4-0, sendo 3 por incisão e 1 a cada 5 mm. Para irradiação, foi utilizado um equipamento de *laser* He-Ne com 8,5 mW e 17 mW de potência, tempo de 15 s por ferida, densidade de potência de 139 mW/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 4,21 J/cm<sup>2</sup> e energia de 0,25 J. Os animais foram distribuídos em 11 grupos (5 em cada): controle, 5 grupos receberam irradiação com 8,5 mW e 5 grupos com 17 mW. Os grupos experimentais foram subdivididos de acordo com os dias de irradiação: um subgrupo recebeu irradiação no 1º, 3º e 5º dias após o ato cirúrgico; os demais subgrupos foram irradiados apenas no 1º ou no 3º ou no 5º dia após o ato cirúrgico. Os autores observaram que, dos

grupos irradiados com 8,5 mW, apenas o que recebeu energia no 5º dia após o ato cirúrgico apresentou alteração em relação ao seu controle, consistindo de discreta redução do infiltrado inflamatório e um leve aumento na síntese de fibras colágenas ( $p < 0,05$ ). Todos os grupos irradiados com 17 mW apresentaram diferenças em relação ao controle, porém nenhuma diferença entre os subgrupos. Foi encontrada importante redução do infiltrado inflamatório e aumento de síntese de fibras colágenas. Em conclusão, os autores afirmaram que a LLLT com He-Ne pode promover a cicatrização de feridas cirúrgicas, sendo a melhor potência a de 17 mW, com DE de 4,1 J/cm<sup>2</sup>.

## **3.2 Laser infravermelho**

### **3.2.1 Estudos *in vitro***

WEBB & DYSON (2003) investigaram o efeito da LLLT de 880 nm em fibroblastos de cicatrizes hipertróficas e de pele. As amostras foram obtidas a partir de biópsias de cicatrizes hipertróficas e pele adjacente de mulheres chinesas de 20 anos de idade submetidas a cirurgias de correção de cicatriz nas regiões de ombro e pescoço. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM e lavadas em solução salina (PBS), sendo armazenadas em frascos de cultura e permanecendo em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após confluência (80 %), os fibroblastos foram caracterizados por imunohistoquímica para excluir outros tipos celulares e assegurar a homogeneidade das amostras. Em seguida, as células derivadas de cicatrizes hipertróficas e de pele foram divididas em grupos (de acordo com as doses de energia): *sham*, 2,4 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>; e subgrupos (de acordo com os dias de contagem): 1, 2, 3, 4 e 5. Os parâmetros utilizados para irradiação foram: potência (P) de 16 mW; área de secção transversa do feixe de 0,296 cm<sup>2</sup>; densidade de potência (DP)

de  $0,054 \text{ W/cm}^2$  e densidades de energia (DE) de  $2,4 \text{ J/cm}^2$  e  $4 \text{ J/cm}^2$ , correspondendo a tempos de 44,5 s e 74 s e energias de 0,53 e 0,92 J, respectivamente. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar e durante a irradiação, a ponteira do equipamento permaneceu perpendicular ao poço e a 0,4 cm de distância deste. Após a irradiação, os poços foram preenchidos com meio de cultura e levados para estufa. Para a contagem celular, os fibroblastos foram corados com azul de metileno e o procedimento, realizado em espectrofotômetro de 650 nm. O número de fibroblastos de cicatrizes hipertróficas que receberam energia de 5,3 J foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) no quinto dia, em relação ao controle, com diferença de 8,8 %. O número de fibroblastos de pele irradiados com ambas as doses foi menor no quarto e quinto dias, com diferenças de 4,6 e 5,9 %, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Com relação à energia de 0,92 J, houve redução dos fibroblastos de cicatriz hipertrófica, porém não significante; as células de pele irradiadas apresentaram redução no quinto dia, com diferença de 5,3 % ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram, em função das células de pele também terem sido inibidas, que o comprimento de onda estudado não deve ser usado para cicatrização de úlceras, mas que poderia vir a ser uma alternativa no tratamento de cicatrizes hipertróficas com bases em mais estudos futuros.

HOURELD & ABRAHAMSE (2008) investigaram *in vitro* o efeito do *laser* infravermelho de 830 nm em cultura de fibroblastos de feridas de pacientes diabéticos. Como controle, foram utilizadas células não diabéticas de pele e células de feridas diabéticas não irradiadas. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar. Para irradiação foi utilizado *laser* diodo de 830 nm, com potência de 55 mW, com densidade de potência de  $6 \text{ mW/cm}^2$ , área de secção transversa de  $9,1 \text{ cm}^2$ , densidades de energia de  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $16 \text{ J/cm}^2$ , tempos de 825 s ( $E = 45,3 \text{ J}$ ) e 2640 s ( $E = 145,2 \text{ J}$ )

respectivamente. As células foram irradiadas duas vezes com intervalo de 72 h entre as aplicações. Após a segunda irradiação as células foram armazenadas a 37 °C. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizada a técnica do *trypan blue* e caspases 3 e 7 (para verificar apoptose) por luminescência (proporcional à atividade da caspase) em luminômetro. A proliferação celular foi determinada em função da concentração de Fator básico de Crescimento de Fibroblastos (bFGF - *basic Fibroblast Growth Factor*) secretado no meio após as irradiações. As células foram dispostas em microplacas às quais foram adicionados 200 µl de anticorpo anti-FGF. Após 2 h a solução foi removida superficialmente e as células foram lavadas com PBS. Decorridos 30 min, foram adicionados 100 µl de ácido sulfúrico (1 mol/mL) e feita a leitura em espectrofotômetro. Cada experimento foi repetido 4 vezes, considerando-se a média. Os autores concluíram que a resposta celular à LLLT é dose-dependente. Foi constatada proliferação dos fibroblastos irradiados com a DE de 5 J/cm<sup>2</sup>, em relação ao seu controle; os fibroblastos que receberam DE de 16 J/cm<sup>2</sup> tiveram uma redução em sua contagem, quando comparados ao controle.

LEV-TOV *et al.* (2013) investigaram o efeito do LED infravermelho em fibroblastos de pele humana. As células foram cultivadas em meio DMEM modificado, a 37 °C, sendo que cada placa de cultura continha 2 x 10<sup>4</sup> células. Os fibroblastos foram irradiados com LED infravermelho (830 nm) 24 h após a confluência, a partir dos seguintes parâmetros: DP de 360 W/m<sup>2</sup>; DE: 80, 160 e 320 J/cm<sup>2</sup>. O grupo controle recebeu irradiação de fonte de luz não incandescente. A contagem celular foi realizada em triplicata, 48 h após a irradiação, pelo teste de azul de trypan (*Trypan blue*). Verificou-se inibição da proliferação dos fibroblastos em relação ao controle para todas as densidades de energia. O efeito foi dose-dependente: quanto maior a densidade de

energia, maior a inibição da proliferação celular. Os autores ressaltaram o uso da LLLT no comprimento de onda infravermelho como uma possível alternativa para tratamento de cicatrizes fibroproliferativas.

### 3.2.2 Estudos *in vivo*

REZENDE *et al.* (2007) avaliaram a cicatrização por segunda intenção em pele de ratos sob irradiação com *laser* de 830 nm. A amostra consistiu de 48 ratos adultos machos (*Ratus norvegicus, albinus, Wistar*), com massa corporal entre 200 e 230 g. Após anestesia com cloridrato 10 % (4 mL/kg) e tricotomia na região mediana dorsal dos animais, foi utilizado *punch* de 8 mm de diâmetro para obtenção das feridas. Foram formados 3 grupos com 16 animais em cada, da seguinte forma: Grupo 1 (G1): Grupo Controle, sem irradiação das feridas. Grupo 2 (G2): os animais receberam irradiação de *laser* em dose única, com DE de 1,3 J/cm<sup>2</sup>, durante 25 s, com energia total de 1,5 J. Grupo 3 (G3): os animais receberam irradiação de *laser* em dose única, com DE de 3 J/cm<sup>2</sup>, durante 56 s, e energia total de 3,36 J. O equipamento de *laser* utilizado apresentava 60 mW de potência e área de secção transversa do feixe de 0,07 cm<sup>2</sup>. A coleta das amostras foi realizada 3, 7 e 14 dias após a realização das feridas. As biópsias incluíram a pele adjacente à ferida e o tecido lesado em toda sua profundidade. Elas foram armazenadas em formol 10 % por 24 h e, em seguida, fixadas em parafina. As lâminas foram confeccionadas utilizando cortes de 6 µm de espessura do tecido e coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina e tricômio de Masson. A análise histológica foi realizada de modo semiquantitativo, considerando os parâmetros morfológicos: epitélio, infiltrado polimorfonuclear, presença de fibroblastos e neovascularização. O arranjo e a densidade do colágeno também foram avaliados. Os resultados mostraram que no 3º dia não houve diferença histológica significativa na epiderme, entre o grupo controle e os

irradiados; entretanto foram encontradas diferenças na derme, sendo que os grupos G2 e G3 apresentaram maior quantidade de capilares, fibroblastos e colágeno. Sete dias após a realização das feridas, o grupo G1, ao contrário de G2 e G3, não apresentava epitelização completa, o processo inflamatório persistia e o tecido conectivo apresentava-se desorganizado. Foram observados macrófagos no G3, que estavam ausentes no G2. Além disso, a matriz extracelular do grupo que recebeu maior dose estava menos organizada em relação ao outro. No 14º dia, todos os grupos apresentaram epitelização completa. G1 apresentou macrófagos, fibroblastos e neovascularização. G2 e G3 apresentaram maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas alinhadas com o epitélio, sendo que G2 teve melhor arranjo entre as fibras do que G3. Em conclusão, a DE de 1,3 J/cm<sup>2</sup> gerou um melhor resultado no processo de cicatrização em comparação com a DE de 3 J/cm<sup>2</sup>, demonstrando que as respostas celulares à LLLT são dose-dependentes.

AL-WATBAN *et al.* (2007) investigaram o efeito da LLLT com diferentes comprimentos de onda (532 nm, 633 nm, 810 nm e 980 nm) em feridas de ratos diabéticos. A amostra foi constituída por 57 ratos machos *Sprague-Dawley*, distribuídos aleatoriamente em: ratos diabéticos (n = 51) e não diabéticos (n = 6). Os ratos diabéticos foram subdivididos em grupo controle (n = 3) sem irradiação e grupos experimentais (n = 48) subdivididos em função do comprimento de onda: 532 nm (verde); 633 nm (vermelho); 810 nm e 980 nm (infravermelhos) e das densidades de energia padronizadas em 5, 10, 20 e 30 J/cm<sup>2</sup>, conforme os parâmetros de cada equipamento: 532 nm - potência: 143 mW; área: 7 cm<sup>2</sup>; tempo: 4,1; 8,2; 16,3 e 24,5 min. 633 nm - potência: 140 mW; área 9 cm<sup>2</sup>; tempo: 5,4; 10,7; 21,4 e 32,1 min. 810 nm e 908 nm - potência: 200 mW; área: 9 cm<sup>2</sup>; tempo: 3,8; 7,5; 15 e 22,5

min. Para os procedimentos, a anestesia foi realizada com 50 mg/kg de quetamina e 20 mg/kg de xilazina nos ratos não diabéticos; os ratos diabéticos receberam dose 30 % menor. Após depilação com tricótomo elétrico, foram realizadas feridas excisionais de formato oval na região glútea dos animais por meio de bisturi abrangendo epiderme e derme em toda sua profundidade, com áreas entre 78,51 mm<sup>2</sup> e 88,38 mm<sup>2</sup>. Após a cirurgia, os animais receberam irradiação 3 vezes por semana. O grupo controle, segundo o estudo, foi manipulado da mesma forma que os grupos experimentais, mas não recebeu irradiação. Os resultados foram avaliados em função da área da ferida, que foi medida com compasso durante 5 dias por semana, por 3 semanas. Os autores demonstraram que todos os grupos tratados apresentaram maior redução da área da ferida em relação aos não tratados. Verificou-se que a cicatrização nos ratos diabéticos do grupo controle foi mais lenta que a dos ratos não diabéticos; a LLLT, nos parâmetros aplicados, pode ser utilizada para acelerar a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, sendo que o melhor comprimento de onda foi 633 nm com DE de 10 J/cm<sup>2</sup>.

GÜNGÖRMÜS & AKYOL (2009) investigaram o efeito da LLLT de 808 nm em cicatrização de pele de ratos em feridas incisionais feitas com diodo *laser* de alta potência. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* com massa corpórea entre 250 e 300 g. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (3 mg/kg) e seus dorsos foram depilados. Duas incisões de 1,5 cm de comprimento foram realizadas no lado direito e esquerdo do dorso, com auxílio de diodo *laser* de alta potência. As incisões da direita foram eleitas como controle (grupo *laser*) e as da esquerda (grupo *laser* + LLLT) receberam irradiação com LLLT de 808 nm, cujo equipamento possuía densidade de potência de 0,1 W/cm<sup>2</sup>, potência de 100 mW, área de secção transversa de feixe de 1 cm<sup>2</sup>, densidade de energia de

2 J/cm<sup>2</sup>, tempo de 20 s e energia de 20 J por sessão. As aplicações de LLLT foram feitas de modo pontual por 5 dias, sendo a primeira logo após o ato cirúrgico e as demais, a cada dois dias (2º, 4º, 6º e 8º dia). Metade dos animais foi submetida à morte indolor assistida após 10 dias e metade, após 20 dias. As amostras foram coletadas, fixadas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina, para análise de epitelização e infiltrado inflamatório. Os resultados demonstraram que no décimo dia, o grupo *laser* + LLLT apresentou redução significativa do processo inflamatório em relação ao controle; no vigésimo dia, houve melhor epitelização do grupo experimental. Em conclusão, a incisão com diodo *laser* (4 W) em conjunto com LLLT de 808 nm (10 J/ cm<sup>2</sup>) foi benéfica no processo de cicatrização em pele de ratos.

AKYOL & GÜNGÖRMÜS (2010) investigaram o efeito da LLLT em feridas incisionais por diodo *laser* em ratos diabéticos. Foram utilizados 18 ratos Wistar entre 250 e 300 g, induzidos à diabetes por injeção intraperitoneal de estreptozotocina a 50 mg/kg. Após 48 h, os ratos apresentando glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram incluídos no estudo. Para realização dos procedimentos, os animais foram anestesiados com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (3 mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, o dorso foi depilado e foram realizadas 3 incisões de 1,5 cm em cada rato, sendo uma incisão do lado esquerdo do dorso realizada com diodo *laser* de alta potência (4 W), que recebeu LLLT de 808 nm (grupo experimental, G3) e duas incisões do lado direito, uma realizada com bisturi lâmina nº 15 (grupo controle, G1) e outra com diodo *laser* (grupo controle, G2). Todas as incisões foram suturadas com fio poliglicólico 3-0. Os autores consideraram n = 18 em cada grupo. Os parâmetros de irradiação do grupo experimental com LLLT de 808 nm foram: densidade de potência 0,1 W/cm<sup>2</sup>; tempo: 20 s;



DE:  $2 \text{ J/cm}^2$ ; distância de 1 cm da ferida. Foram realizadas 5 irradiações, a primeira logo após a cirurgia e as demais a cada dois dias. Foram coletadas amostras no 10º e 20º dias, de 9 ratos em cada. A análise histopatológica realizada foi por hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de epitelização e grau de inflamação. Foram aplicados testes estatísticos de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e teste-U. Quanto à reepitelização, houve diferença entre os 3 grupos, no 10º dia, sendo que G1 apresentou menor grau de reepitelização em relação a G2 e G3. As feridas dos grupos incisionados com *laser* (G2 e G3) cicatrizaram mais rápido que aquelas do grupo com bisturi (G1). No 10º dia, as feridas de G1 e G2 encontravam-se predominantemente em fase aguda, enquanto a de G3 apresentava mais tecido de granulação. No 20º dia não houve diferença quanto ao grau de inflamação entre os grupos. Concluiu-se que a incisão com diodo *laser* em conjunto com LLLT de 808 nm com DE de  $10 \text{ J/cm}^2$  foi benéfica para a cicatrização de feridas em ratos diabéticos.

### 3.3 Birrefringência em pele

SILVA *et al.* (2006), em estudo autocontrolado, investigaram a organização das fibras colágenas em pele de ratos queimados após irradiação com LLLT vermelha direcionada com vetores de radiação. Foram utilizados 20 ratos *Wistar*, adultos, machos, com 300 g. Após anestesia com Avertin (0,025 mL/g), o dorso dos animais foi depilado e foram realizadas 3 queimaduras circulares com diâmetro de 6 mm a partir de haste cilíndrica de cobre a 77 K. As lesões foram divididas em controle (C), que não recebeu irradiação; experimentais:  $L_{\parallel}$  que recebeu irradiação alinhada por polarizador de campo elétrico e paralelo à lesão e  $L_{\perp}$  que recebeu irradiação direcionada perpendicularmente à lesão. Foi utilizado *laser* He-Ne (632,8 nm) com potência de 10 mW; DE de  $1 \text{ J/cm}^2$ ; tempo de 3 min. A coleta das amostras foi realizada em 5 dias distintos, sendo 4 animais em cada um: 3, 7, 10, 14 e

17 dias após a queimadura. Após coleta, os tecidos foram fixados em parafina e foram preparadas as lâminas para análise. Os resultados demonstraram que o vetor de campo eletromagnético interferiu no alinhamento do colágeno na derme; as lesões irradiadas com a polarização paralela à lesão apresentaram maior retardo óptico (RO) do que as lesões irradiadas perpendicularmente, indicando que o colágeno ficou mais organizado no grupo L<sub>II</sub>.

## **MÉTODOS**

## **4. MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do estudo e Comitê de ética em pesquisa**

O presente estudo é experimental, analítico, controlado, aleatorizado, prospectivo, com duplo mascaramento (patologista e estatístico).

Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), número 1308/08 (Apêndice 1).

### **4.2 Amostra**

Foram utilizados 60 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*), adultos jovens de 8 semanas, machos, com massa corpórea entre 250 e 300g, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Os animais foram confinados no biotério deste laboratório, em gaiolas individuais de plástico, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração consumidos *ad libitum*. O ambiente foi mantido, por meio de dispositivos eletrônicos, à temperatura constante de 22°C, com manutenção do grau de umidade e períodos controlados de 12 horas de luz, de acordo com os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Houve avaliações diárias para observação de sinais que evidenciem infecção secundária.

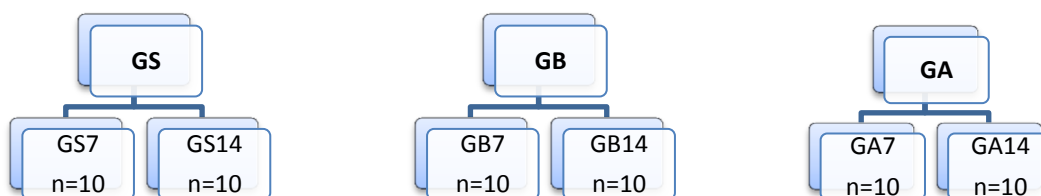
### **4.3 Delineamento do estudo**

#### **4.3.1 Distribuição da amostra**

Os 60 animais foram distribuídos, aleatoriamente, através de

programa disponível no *site* [www.randomization.com](http://www.randomization.com) (Apêndice 2), em 3 grupos (de acordo com a energia) e 6 subgrupos (de acordo com o dia de coleta de tecido), sendo que a amostra de cada grupo foi igual a 10 (figura 1). O grupo simulado (GS) não recebeu energia; os grupos experimentais Baixa Dose (GB) e Alta Dose (GA) receberam 1,5 J e 60 J por ponto, respectivamente.

O GS foi distribuído em 2 subgrupos (GS7, GS14), que foram submetidos à realização de incisão cutânea cirúrgica e à simulação de *laser*terapia com a caneta de *laser* desligada. Os grupos experimentais (GB e GA) foram distribuídos, cada um, em 2 subgrupos (GB7, GB14; GA7, GA14), que foram submetidos à realização de incisão cutânea cirúrgica e à aplicação de *laser* infravermelho.



**Figura 1.** Esquema da distribuição dos grupos e subgrupos simulados e experimentais. GS: Grupo Simulado; GB: Grupo Experimental Baixa Energia (1,5 J) ; GA: Grupo Experimental Alta Energia (60J).

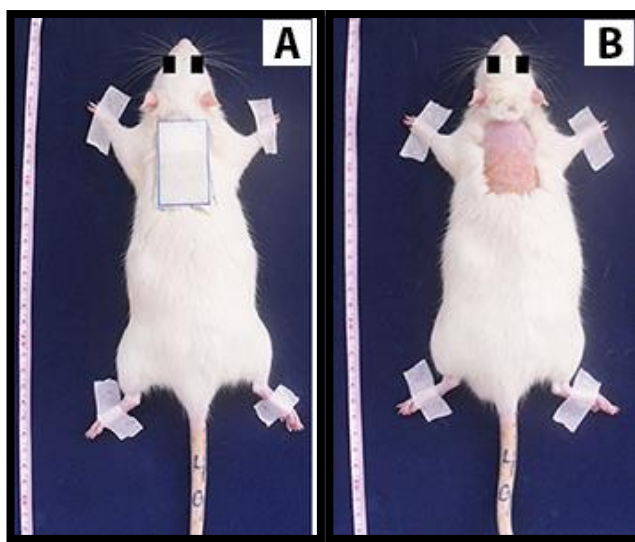
A coleta de tecido para análise foi realizada no sétimo dia após a incisão cutânea cirúrgica nos subgrupos GS7, GB7, GA7. Nos subgrupos GS14, GB14, GA14, a coleta foi realizada no décimo quarto dia após o ato operatório. Encerrada a coleta, os animais foram induzidos à morte induzida indolor .

#### 4.3.2 Anestesia

Previamente a cada procedimento: cirurgia, aplicação de *laser* e coleta de tecido, foi realizada anestesia com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (50mg/kg) no músculo gastrocnêmio. Foi utilizada seringa de 1 mL e agulha 13 x 3 mm (30 G ½).

#### 4.3.3 Incisão cutânea

Para obtenção dos ferimentos cutâneos cirúrgicos no dorso dos animais, foi demarcado um retângulo com auxílio de gabarito de acetato (3 x 6 cm) e caneta dermográfica a partir da linha transversa interescapular superior, em sentido crânio-caudal (figura 2A). Em seguida foi realizada epilação digital (PINFILDI *et al.*, 2005), conforme figura 2B.

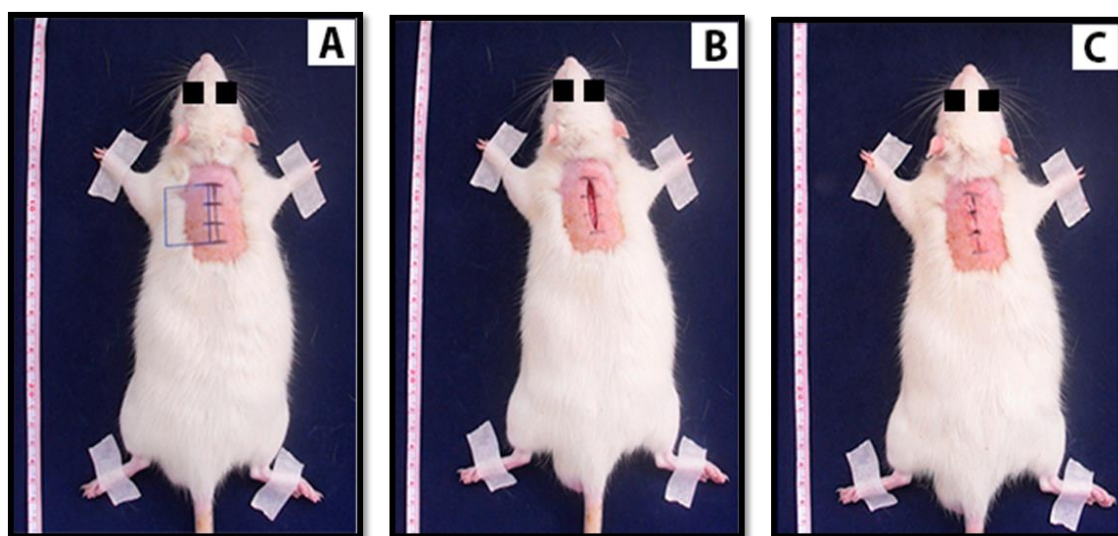


**Figura 2** – Epilação digital

**2A.** Demarcação com gabarito de acetato da área a ser epilada.

**2B.** Região dorsal do animal após epilação digital.

A partir de outro gabarito de acetato (2 x 3 cm) foi demarcada a linha de incisão e dos pontos de sutura, com caneta dermatográfica (figura 3A). A incisão com comprimento de 3 cm, na qual foram delimitados pontos equidistantes de 1 cm a partir das extremidades e entre si, para a realização da sutura. Com auxílio de um bisturi, com lâmina nº15 estéril, foi realizada a incisão na linha mediana dorsal, sobre a linha traçada acima descrita, incluindo pele e panículo carnosos até a fáscia muscular (figura 3B). A hemostasia foi realizada com suave manobra de compressão com gaze estéril seca. Em seguida, a incisão foi suturada por ponto simples com fio monofilamentar de náilon 4-0, de forma previamente padronizada (figura 3C). Ao final do procedimento foi realizada em todos os ratos analgesia com cloridrato de tramadol (5mg/kg).



**Figura 3** – Incisão cirúrgica e sutura

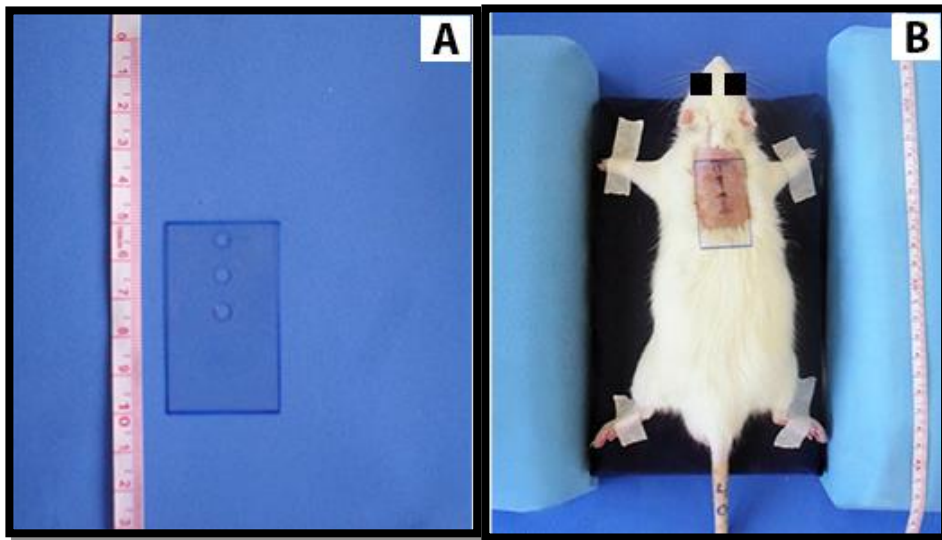
**Figura 3A.** Demarcação no dorso do animal com gabarito de acetato e caneta dermatográfica da incisão com 3 cm e dos pontos de sutura equidistantes de 1 cm entre si e a partir das extremidades.

**Figura 3B.** Pele incisionada na região demarcada.

**Figura 3C.** Pontos de sutura equidistantes de 1 cm.

#### 4.3.4 Aplicação de *laser*

Após a realização da incisão, cada animal foi posicionado para receber irradiação. Foi utilizado gabarito de acetato (2 x 5 cm), em que foram realizadas 3 aberturas com *punch* de 3 mm, equidistantes 1 cm (figura 4A). O gabarito foi posicionado no dorso do animal de modo que coincidissem com os pontos de irradiação: 1 ponto a cada 1 cm, a partir de 0,5 cm das extremidades de modo que cada um ficasse no ponto médio entre os pontos de sutura (figura 4B).



**Figura 4** – Preparo para irradiação.

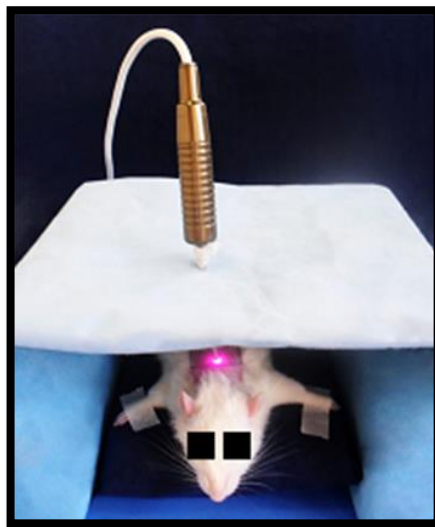
**4A.** Gabarito de acetato com 3 pontos equidistantes de 1 cm para aplicação de *laser*.

**4B.** Gabarito posicionado no dorso do animal para aplicação de *laser*.

Após os posicionamentos do animal, do gabarito e da caneta *laser*, foi realizada a aplicação de LLLT de modo pontual, com contato e perpendicular à incisão (figura 5). A ponteira foi posicionada em suporte de modo que permanecesse imóvel durante o procedimento; foi envolvida por filme plástico de policloreto de vinila (PVC), que era trocado após a



irradiação em cada animal. A aplicação, em todos os grupos, foi efetuada em cima da incisão em três pontos, que foram padronizados com gabarito de acetato, sendo demarcados a cada 1cm, a partir de 0,5cm da extremidade cranial até 0,5cm da extremidade caudal, de maneira que o local de irradiação fosse o ponto médio entre cada ponto de sutura, conforme descrito.



**Figura 5.** Aplicação de LLLT mediante uso de gabarito de acetato e com auxílio de suporte para apoio da caneta de *laser*.

As irradiações com *laser* infravermelho foram realizadas a cada 24 horas, sempre no período matutino, sendo a primeira 5 minutos após o ato cirúrgico. Todos os subgrupos simulados e experimentais foram submetidos respectivamente à simulação ou irradiação durante 5 dias consecutivos.

Foi utilizado o equipamento de *Laser* de InGaAlP Flash Lase III<sup>®</sup> (DMC Equipamentos Médico-odontológicos), com comprimento de onda de 808 nm, potência de 100mW (carta de calibração no Anexo 1),

densidade de potência de  $3,57 \text{ W/cm}^2$ , área de secção transversal do feixe de  $0,028 \text{ cm}^2$ . Nos subgrupos experimentais GB (GB7; GB14) as feridas incisionais foram submetidas à irradiação com densidade de energia por ponto de  $54 \text{ J/cm}^2$ , durante 15 s por ponto. Para os subgrupos experimentais GA (GA7; GA14), a DE do *Laser* infravermelho foi de  $2143 \text{ J/cm}^2$ , durante 600 s por ponto. Para os subgrupos GS (GS7 e GS14), os procedimentos foram realizados de modo semelhante aos demais grupos e com tempo igual ao do grupo de maior exposição à irradiação (GA), porém o equipamento de *laser* permaneceu desligado. A figura 6 apresenta os parâmetros de irradiação para cada grupo.

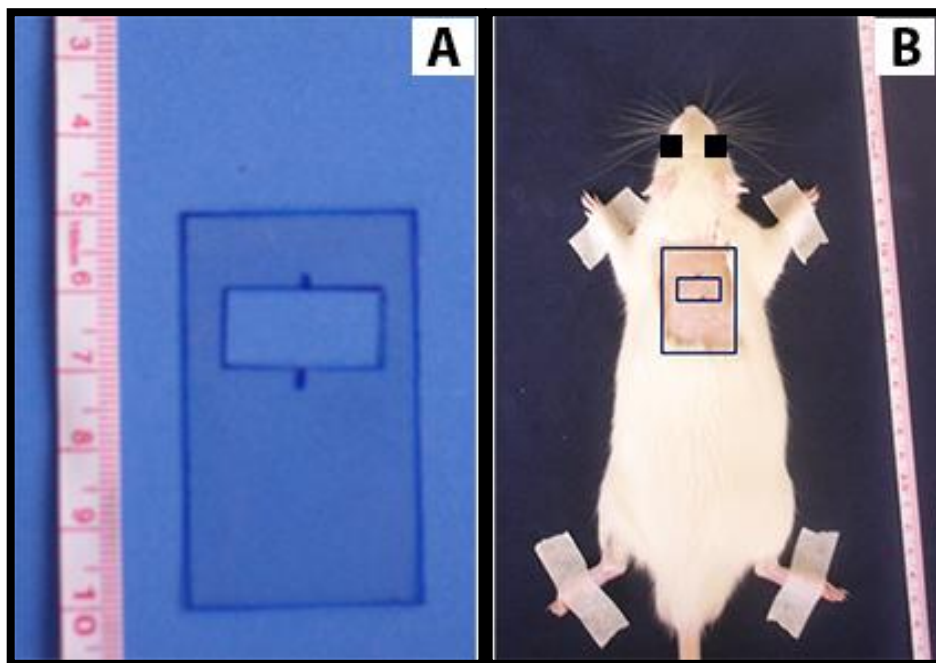
Grupo	GC	GB	GA
E/ponto(J)	0	1,5	60
DE(J/cm <sup>2</sup> )	0	54	2143
t (s)	600	15	600
E total (J)	0	4,5	180

**Figura 6.** Parâmetros utilizados em cada grupo, para irradiação por ponto. E: energia total; DE: densidade de energia; t: tempo; GC: grupo controle; GB: grupo experimental baixa dose; GA: grupo experimental alta dose.

Como o equipamento possui densidade de energia máxima de  $999 \text{ J/cm}^2$ , foi realizado cálculo a fim de que a ferida dos grupos GA recebesse adequadamente a dose de energia: foram acionados 3 disparos em cada ponto com DE de  $714 \text{ J/cm}^2$ , que equivalem ao tempo de 10 minutos e energia de 20 J. Para que o pesquisador acompanhasse a irradiação, foi utilizado um papel para anotação, relacionando cada ponto e o número de disparos recebidos.

#### **4.3.5 Coleta de tecido para análise**

A coleta do material foi obtida no 7º PO (pós-operatório), para os animais dos grupos GC7, GB7, GA7; no 14º PO, para os animais dos grupos GC14, GB14, GA14. No dorso dos animais, com auxílio de gabarito de acetato (3 x 5 cm), no qual foi feita uma abertura em forma de retângulo com as medidas da amostra a ser retirada (1 x 2 cm) e feita uma marcação no ponto médio do lado maior do retângulo de modo a coincidir com a cicatriz (figura 7A). O gabarito foi posicionado no dorso do animal, conforme figura 7B e com caneta dermatográfica, foi demarcada a área de coleta de tecido, que correspondeu ao terço médio da cicatriz abrangendo 1 cm de tecido cicatricial e 2 cm de pele adjacente (1cm de cada lado). Com auxílio de bisturi, a área tecidual correspondente ao terço médio da cicatriz e pele adjacente foi retirada, incluindo tecido cicatricial e dérmico em toda sua profundidade.



**Figura 7** – Preparo para coleta de tecido.

**7A.** Gabarito de acetato para demarcação da área de tecido a ser coletada para análise.

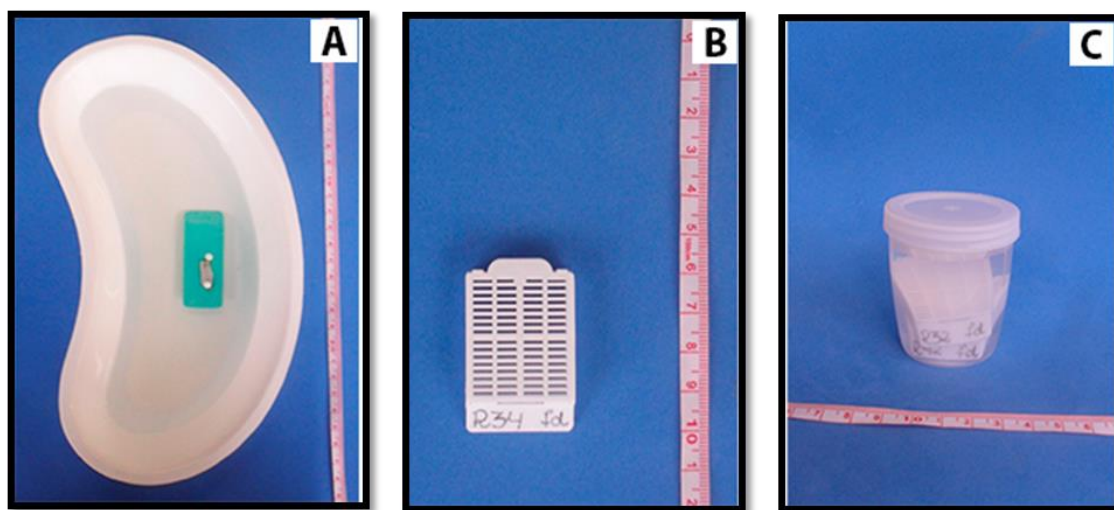
**7B.** Gabarito posicionado para delimitar a área de coleta de tecido cicatricial e pele adjacente, compreendidos no terço médio da cicatriz.

Após obtenção dos tecidos, os animais foram submetidos à MII com hiperdosagem da mistura anestésica via intraperitoneal por cloridrato de quetamina (1g/Kg) e cloridrato de xilazina (500mg/Kg), seguida de secção dos grandes vasos cervicais.

#### **4.4 Preparo das amostras de tecido para análises histológicas**

As amostras das cicatrizes cutâneas foram fixadas por meio de alfinetes coloridos, em que cada cor correspondia ao número do respectivo animal (figura 8A). As amostras permaneceram imersas em formol tamponado a 10% por 40 minutos e o controle foi feito mediante uma

relação em folha de papel (Apêndice 3). Em seguida, os tecidos foram retirados da borracha e alocados separadamente em grades k-7 identificadas (figura 8B), que permaneceram armazenadas em frascos de coleta individuais com solução de formaldeído a 10% (figura 8C).



**Figura 8** – Amostra coletada.

**8A:** amostra fixa com alfinete colorido e mantida em formol tamponado 10% logo após retirada.

**8B.** Cassete histológico identificado com número do animal e dia de coleta para alojar a amostra coletada.

**8C.** Frasco contendo formol tamponado a 10 % para armazenamento das amostras

As amostras coletadas foram enviadas ao laboratório da Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Morfologia da UNIFESP para confecção das lâminas histológicas. O material coletado foi processado histologicamente conforme protocolo do Laboratório de Patologia da UNIFESP e emblocado em parafina. De cada bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos, montados em lâminas histológicas, previamente

silanizadas (Organosilano, marca Sigma<sup>®</sup>), exceto as lâminas para análise de birrefringência. Os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram corados pela técnica histoquímica de hematoxilina e eosina e para birrefringência de fibras colágenas; os cortes de 3 µm foram submetidos à técnica de imunohistoquímica de colágeno tipo I e tipo III.

#### **4.4.1 Histoquímica**

##### **4.4.1.1 Técnica de coloração por hematoxilina-eosina**

As lâminas com cortes de 5 µm encaminhadas para coloração histoquímica foram previamente desparafinizadas com xilol em 3 banhos de 5 minutos e hidratadas com concentrações decrescentes de álcool 100%, 95%, 80%, 70% e água.

Para a coloração, as lâminas permaneceram 20 minutos imersas em Hematoxilina de Harry's; em seguida foram lavadas em água corrente por 1 vez. Após, foram lavadas 5 segundos com diferenciador para hematoxilina, novamente em água corrente por 2 vezes. em solução amoniacal por 1 minuto e em água corrente por 1 vez.

Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em Eosina Y 1% em álcool 95% por 5 a 7 minutos. Foi realizada bateria de montagem: 2 vezes em álcool 95%, 3 vezes em álcool 100% e 3 vezes em xilol. A montagem foi efetuada em meio permanente (Ervmount- Erviegas).

#### **4.4.2 Imunohistoquímica**

##### **4.4.2.1 Técnica imunohistoquímica para pele de rato**

Para reação de imunohistoquímica de colágeno do tipo I e III, foram utilizados anticorpos de rato.

Os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram aderidos em lâminas tratadas com silano, que permaneceram em estufa a 60°C por 16 a 18 horas. Posteriormente, foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol a temperatura ambiente e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 70% ) e água.

A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 37° C com as lâminas imersas em solução de ácido acético 0,5M por 90 minutos. Em seguida foi efetuado o bloqueio da peroxidase endógena com 3 banhos de 5 minutos com peróxido de hidrogênio 10 volumes. As lâminas foram lavadas posteriormente em água corrente por 2 vezes, em água deionizada 1 vez e em tampão fosfato de sódio (PBS) por 1 vez. Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de caseína 2% em PBS por 60 minutos (temperatura ambiente).

Para incubação foram utilizados anticorpos primários de rato para colágeno tipo I (Abcam) e colágeno tipo III (Abcam), que foram diluídos em solução de caseína 1% em PBS.(colágeno tipo I – 1:1000; colágeno tipo III – 1:20) e mantidos a 4° C, overnight (18 horas). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS.

Como complemento da reação de imunoperoxidase, usou-se o Polímero Histofine da Biogen por 30 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as lâminas foram imersas em 3 banhos de 5 minutos com PBS.

Em seguida foi realizada a revelação com diaminobenzidina (DAB) Sigma para peroxidase, por 5 minutos em temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 vezes. Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harry's por 1 minuto..

A desidratação das lâminas foi realizada em concentrações crescentes de álcool e diafanização em xilol. A montagem foi realizada com historesina da Erviegas.

Para obtenção dos controles negativos foi realizado o processo acima descrito, porém os anticorpos primários foram omitidos.

## **4.5 Análise morfológica**

### **4.5.1 Hematoxilina-eosina**

Os cortes corados pela técnica de hematoxilina-eosina foram analisados microscopicamente e suas características (intensidade do infiltrado inflamatório, fibroblastos, vasos) foram anotadas de forma semi-quantitativa.

Foi realizada a leitura das lâminas em microscópio óptico Leica™ com uma lente ocular de 10 vezes de aumento e objetiva de 40X, totalizando um aumento de 400 vezes.

O avaliador (patologista), não tinha conhecimento sobre a qual grupo pertencia cada lâmina. Para a avaliação, foi selecionada a região central da cicatriz, compreendida entre epiderme e panículo carnosos (Apêndice 4). A escala adotada foi padronizada com escores de 0 a 3, sendo 0 ausência do evento avaliado; 1 presença do evento avaliado de modo discreto; 2: presença do evento avaliado de modo moderado; 3: presença do evento avaliado de modo intenso. Foi realizada a média desses campos para obtenção dos resultados finais.

### **4.5.2 Imunohistoquímica de colágeno tipo I e tipo III**

Para realização da quantificação de colágeno tipo I e tipo III foram realizadas fotomicrografias com objetiva de 40X da região central da cicatriz, conforme descrito na análise da coloração de HE. Foi utilizado



microscópio Leica<sup>TM</sup>.

Para a quantificação do colágeno no tecido cicatricial, as fotomicrografias foram recortadas no programa de imagen Microsoft Office<sup>TM</sup> 2010 de modo que toda a pele adjacente fosse excluída. A análise quantitativa das imagens obtidas foi realizada através do programa QWin Plus V3 Leica<sup>TM</sup>. As quantificações foram obtidas em pixels convertidos automaticamente pelo programa em micrometros quadrados e percentual de área marcada referente ao tipo de colágeno avaliado; sendo que 1 pixel correspondia a  $0,16 \mu\text{m}^2$ . Foram realizadas 3 medidas e adotada a média. O avaliador não tinha conhecimento a qual grupo pertencia cada lâmina. Os dados foram tabulados e encaminhados para análise estatística.

#### **4.6 Birrefringência de fibras colágenas**

A análise das fibras de colágeno foi realizada com base em uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas: a birrefringência intrínseca, por microscopia de polarização.

Previamente à análise de birrefringência, as lâminas histológicas permaneceram imersas por 30 minutos em água destilada (VIDAL *et al.*, 1987). Após o período de imersão, foram cobertas por lamínulas, contendo água destilada nas interfaces.

As medidas de retardo óptico (RO) em nm, foram obtidas pela microscopia de luz polarizada no microscópio Leica, com uma objetiva Pol 10x/0,22, condensador 0,9, compensador de Sénarmont 1/4, luz monocromática = 546 nm, obtidas por meio de um filtro de interferência Leica; no Laboratório de Materiais Vítreos (LAMAV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para obtenção das medidas, o eixo longo da cicatriz foi mantida a aproximadamente  $45^\circ$  em relação aos polarizadores do microscópio.

A partir destes parâmetros foram realizadas 5 medidas de RO, em duas regiões: cicatriz e pele adjacente à direita ou à esquerda da incisão. Os lados da cicatriz a serem avaliados foram aleatorizados no programa disponível em “www.randomization.com” (Apêndice 5). Foram desprezados os valores extremos (maior e menor) e realizada a média dos 3 restantes e o valor multiplicado por 1,33 (valor do índice de refração da água).

#### 4.7 Análise Estatística

Todos os dados coletados referentes à morfometria e birrefringência foram tabulados e submetidos à análise estatística. Foi utilizado o programa SPSS 20.0.

Foram descritas as médias dos escores atribuídos a cada parâmetro da histoquímica (hematoxilina-eosina), de imunohistoquímica e de retardo óptico (birrefringência de fibras colágenas), segundo os grupos GS, GA e GB e o dia de coleta com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (KIRKWOOD & STERNE, 2006).

Os grupos foram comparados para cada parâmetro com uso de análises de variâncias (ANOVA) com dois fatores (NETER *et. al.*, 1996), sendo grupos e dias de coleta; as estimativas dos parâmetros foram realizadas com método de mínimos quadrados para evitar problemas com a ausência de normalidade de distribuição testada com uso do teste Kolmogorov-Smirnov (KIRKWOOD & STERNE, 2006). Foram utilizadas comparações múltiplas de Bongferroni (NETER *et. al.*, 1996) quando necessárias para comparação dos grupos e ou dias de sacrifício dois a dois. Adotou-se  $p < 0,05$ , ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade (nível de significância).

## **RESULTADOS**

## 5.RESULTADOS

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre GS, GA e GB, segundo teste ANOVA, na quantidade de fibroblastos ( $p = 0,576$ ), de vasos ( $p = 0,894$ ) e de tecido de granulação ( $p = 0,364$ ) conforme apresentado na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

**Tabela 1. Análise de fibroblastos pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.**

Variável	Grupo	7° dia				14° dia				p
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	
Fibroblastos	GS	2,00	0,47	2	10	1,50	0,53	1,5	10	0,576
	GB	2,10	0,32	2	10	1,40	0,52	1	10	
	GA	2,11	0,33	2	9	1,70	0,82	1,5	10	

Teste ANOVA

**Tabela 2. Análise de vasos pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.**

Variável	Grupo	7° dia				14° dia				p
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	
Vasos sanguíneos	GS	1,50	0,85	1	10	1,10	0,32	1	10	0,894
	GB	1,60	0,70	1,5	10	1,10	0,32	1	10	
	GA	1,33	0,50	1	9	1,20	0,42	1	10	

Teste ANOVA

**Tabela 3. Análise de tecido de granulação pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.**

Variável	Grupo	7° dia				14° dia				p
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	
Tecido de granulação	GS	1,50	0,97	1	10	1,30	0,48	1	10	0,364
	GB	1,89	0,78	2	9	1,40	0,52	1	10	
	GA	2,14	0,69	2	7	1,29	0,49	1	7	

Teste ANOVA

Em relação ao dia de coleta da análise de hematoxilina-eosina, foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa do 14º dia em relação ao 7º dia, onde houve redução de fibroblastos ( $p < 0,001$ ), vasos sanguíneos ( $p = 0,021$ ) e tecido de granulação ( $p = 0,010$ ), de acordo com a Tabela 4 e os gráficos apresentados nos Apêndices 6, 7 e 8.

**Tabela 4. Comparação das variáveis analisadas através da coloração de hematoxilina-eosina entre os dias de coleta.**

Variável	Comparações	Diferença da média	Erro padrão	p
Fibroblastos	7º dia – 14º dia	0,54	0,14	<0,001
Vasos Sanguíneos	7º dia – 14º dia	0,34	0,14	0,021
Tec. Granulação	7º dia – 14º dia	0,52	0,19	0,010

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

A intensidade do infiltrado inflamatório, também observada na análise de hematoxilina-eosina, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos GS, GA e GB ( $p = 0,810$ ) de acordo com o teste ANOVA, demonstrado na Tabela 5; nem com relação aos dias de coleta como demonstrado no gráfico do Apêndice 9.

**Tabela 5. Análise de infiltrado inflamatório pela coloração de hematoxilina-eosina de cada grupo segundo dias de coleta.**

Variável	Grupo	7° dia				14° dia				p
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	
Infiltrado	GS	1,30	0,67	1	10	1,00	0,00	1	10	0,810
	GB	1,30	0,67	1	10	1,10	0,32	1	10	
	GA	1,11	0,33	1	9	1,10	0,32	1	10	

Teste ANOVA

Na tabela 6 está relacionada a análise descritiva dos dados de colágeno tipo I e tipo III em percentual de área em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) na região da cicatriz dos grupos em que foram coletadas as amostras de tecido no 7° dia e na tabela 10 está relacionada a análise descritiva dos dados de colágeno tipo I e tipo III em percentual de área em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) na região da cicatriz dos grupos em que foram coletadas as amostras de tecido no 14° dia.

**Tabela 6. Descrição dos percentuais de área de colágeno tipo I e tipo III no 7° dia.**

Variável	Grupo	7° dia			
		Média	DP	Mediana	n
Colágeno I	GS	21,29	8,51	17,65	10
	GB	5,69	3,85	4,64	10
	GA	2,68	2,42	2,11	10
Colágeno III	GS	20,91	7,03	23,37	10
	GB	21,93	11,92	22,87	10
	GA	19,63	10,87	22,86	10

**Tabela 7. Descrição dos percentuais de área de colágeno tipo I e tipo III no 14º dia**

Variável	14º dia				
	Grupo	Média	DP	Mediana	n
Colágeno I	GS	15,84	5,45	15,53	10
	GB	8,82	5,04	8,64	10
	GA	7,44	3,31	6,84	10
Colágeno III	GS	30,49	9,02	27,71	10
	GB	25,55	7,06	27,37	10
	GA	15,08	4,48	15,14	10

Na tabela 8, segundo o teste ANOVA com dois fatores o percentual de área de colágeno tipo I apresentou comportamentos dos grupos entre os dias de sacrifício estatisticamente diferentes ( $p = 0,007$ ) (Apêndice 10). Já o percentual de área de colágeno III apresentou diferença média estatisticamente significativa apenas entre os grupos ( $p = 0,021$ ) independente do dia de sacrifício (Apêndice 11).

**Tabela 8. Comparações das médias de colágeno tipo I e tipo III segundo grupos e dias de coleta**

Variável	Comparações	p
Colágeno I	Grupos	<b>&lt;0,001</b>
	Dias de coleta	0,550
	Grupos x Dias de coleta	<b>0,007</b>
Colágeno III	Grupos	<b>0,021</b>
	Dias de coleta	0,254
	Grupos x Dias de coleta	0,071

Teste: ANOVA

O percentual médio de área de colágeno I, segundo a Tabela 9, foi estatisticamente menor nos grupos GB e GA em qualquer dia em comparação com controle no 7º dia ( $p < 0,05$ ), sendo que nas comparações: GS7 X GB7, GS7 X GA7, GS7 X GB14, GS7 X GA14 a significância foi  $p < 0,001$ ; GB7 X GS14 a significância foi  $p = 0,001$ ; GS14 X GA14 a significância foi  $p = 0,013$ . Também foram estatisticamente menores os percentuais de área de colágeno I dos grupos experimentais em relação ao controle no 14º dia ( $p < 0,001$ ), com exceção apenas do GB no 14º dia ( $p = 0,056$ ).

**Tabela 9. Comparações dos percentuais de área de colágeno tipo I entre os grupos ou dias de coleta.**

Variável	Comparações	Diferença Média	Erro Padrão	p
Colágeno I	GS7 x GB7	15,60	2,31	<b>&lt;0,001</b>
	GS7 x GA7	18,61	2,31	<b>&lt;0,001</b>
	GS7 x GS14	5,45	2,31	0,333
	GS7 x GB14	12,47	2,31	<b>&lt;0,001</b>
	GS7 x GA14	13,85	2,38	<b>&lt;0,001</b>
	GB7 x GA7	3,00	2,31	>0,999
	GB7 x GS14	-10,15	2,31	<b>0,001</b>
	GB7 x GB14	-3,13	2,31	>0,999
	GB7 x GA14	-1,75	2,38	>0,999
	GA7 x GS14	-13,15	2,31	<b>&lt;0,001</b>
	GA7 x GB14	-6,14	2,31	0,158
	GA7 x GA14	-4,76	2,38	0,760
	GS14 x GA14	7,02	2,31	0,056
	GS14 x GA14	8,40	2,38	<b>0,013</b>
	GB14 x GA14	1,38	2,38	>0,999

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni



O percentual médio de área de colágeno III, segundo a tabela 10, foi estatisticamente menor no GA em comparação ao controle ( $p = 0,042$ ) independente do dia de coleta.

**Tabela 10. Comparações dos percentuais de área de colágeno tipo III entre os grupos ou dias de coleta.**

Variável	Comparações	Diferença Média	Erro Padrão	p
Colágeno III	GS x GB	1,56	3,21	>0,999
	GS x GA	7,93	3,11	<b>0,042</b>
	GB x GA	6,37	3,21	0,159

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

Nos Apêndices 12 e 13 estão representadas as fotomicrografias de imunohistoquímica de colágeno tipo I e tipo III dos grupos estudados.

Na tabela 11 está relacionada a análise descritiva dos dados de retardo óptico em nanômetros (nm) de pele adjacente e de cicatriz dos grupos em que foram coletadas as amostras de tecido no 7º dia. Estão relacionados média, desvio padrão (DP) e mediana.

**Tabela 11 - Descrição das médias de retardo óptico segundo grupos com amostras coletadas no 7º dia.**

Variável	Grupo	7º dia			n
		Média	DP	Mediana	
Retardo óptico	GS	5,21	1,16	25,32	10
Pele adjacente	GB	7,14	0,45	7,20	10
	GA	7,00	1,02	7,20	10
Retardo óptico cicatriz	GS	3,88	0,74	3,66	10
	GB	6,18	0,81	6,10	10
	GA	6,03	1,08	6,43	10

Na tabela 12 está relacionada a análise descritiva dos dados de retardo óptico em nanômetros (nm) de pele adjacente e de cicatriz dos grupos em que foram coletadas as amostras de tecido no 14º dia. Estão relacionados média, desvio padrão (DP) e mediana.

**Tabela 12 - Descrição das médias de retardo óptico segundo grupos com amostras coletadas no 14º dia.**

Variável	Grupo	14º dia			
		Média	DP	Mediana	n
Retardo óptico	GS	4,99	0,89	4,88	10
Pele adjacente	GB	6,92	1,39	6,87	10
	GA	7,07	0,76	7,09	10
Retardo óptico cicatriz	GS	3,88	0,91	3,77	10
	GB	6,10	1,18	5,65	10
	GA	5,99	0,77	5,65	10

O teste ANOVA com dois fatores mostrou as médias de retardo óptico de pele adjacente apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GS, GA e GB ( $p < 0,001$ ), mas não houve diferença entre os dias de coleta e o comportamento dos grupos entre os dias de coleta foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) como está demonstrado no gráfico do Apêndice 14. O mesmo foi observado com os valores de RO da cicatriz (Apêndice 15).

Ao comparar os grupos GS, GA e GB, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que houve aumento do RO na pele adjacente do grupo GA comparado ao GS ( $p < 0,001$ ) e do grupo GB comparado ao GS ( $p < 0,001$ ); não houve diferença significativa de valores de RO de pele adjacente entre os grupos GA e GB ( $p > 0,999$ ) (Tabela 3).

Os valores de RO da cicatriz, segundo as comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que houve aumento do RO do grupo GA comparado ao GS ( $p < 0,001$ ) e do grupo GB comparado ao GS ( $p < 0,001$ ); não houve diferença significativa de valores de RO da cicatriz entre os grupos GA e GB (Tabela 13).

**Tabela 13. Resultado das comparações entre os grupos para as médias de retardo óptico.**

Variável	Grupo	Média	Erro Padrão	p
Retardo óptico interface	GS x GB	-1,93	0,31	<b>&lt;0,001</b>
	GS x GA	-1,94	0,31	<b>&lt;0,001</b>
	GB x GA	-0,01	0,31	>0,999
Retardo óptico cicatriz	GS x GB	-2,26	0,29	<b>&lt;0,001</b>
	GS x GA	-2,13	0,29	<b>&lt;0,001</b>
	GB x GA	0,13	0,29	>0,999

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

No Apêndice 16 estão representadas as fotomicrografias de birrefringência de fibras colágenas dos grupos estudados.

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A cicatrização é um dos principais objetos de estudo da Fisioterapia, que utiliza diversos recursos biofísicos para modular ou acelerar esse processo. Dentre eles destacam-se o ultrassom (ENNI *et al.*, 2006; TACANI *et al.*, 2010), a eletroterapia (LIEBANO *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2013) e a fototerapia de baixa intensidade (HOURELD *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2012), sendo esta última, um dos recursos mais utilizados para tratamentos de cicatrização tecidual pela sua facilidade de manuseio, simplicidade de aplicação, resultados satisfatórios e ausência de efeitos colaterais.

Nesse sentido, a literatura é bem ampla, sobretudo no que se refere a estudos experimentais, que evidenciam os efeitos benéficos da LLLT no processo de cicatrização desde a fase inflamatória até a de remodelamento, em diferentes tecidos como pele, tendão, osso e tecido nervoso (REZENDE *et al.*, 2007; ROCKIND *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2011).

### 6.1 Sobre os métodos

Os comprimentos de onda que abrangem o espectro vermelho e infravermelho são os mais pesquisados (GAL *et al.*, 2006; SILVA *et al.* (2006; AL-WATBAN *et al.* 2007; AKYOL & GÜNGÖRMÜS, 2010). No que concerne o espectro infravermelho, estudos *in vitro* têm demonstrado que doses mais elevadas e aplicadas repetidas e seguidas vezes possuem efeito inibitório na proliferação celular, sobretudo de fibroblastos (LEVTOV *et al.*, 2013-a; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008). Esses achados motivaram a realização do presente estudo a fim de investigar se tal

comportamento inibitório seria observado no modelo *in vivo*, uma vez que não foram encontrados estudos nesse sentido nas buscas realizadas.

Assim, o presente trabalho utilizou o modelo experimental de cicatrização de pele em ferida incisional em ratos, o que auxilia o esclarecimento de mecanismos fisiológicos, para perspectivas de estudos clínicos. Além disso, o uso desse animal para estudos como este, possibilita comparações com resultados obtidos na literatura, facilitando o desenvolvimento da investigação (PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009).

Na literatura verifica-se que o rato é muito utilizado como modelo animal de estudo para cicatrização de pele e de retalhos (LUCAS *et al.*, 2002; LIEBANO *et al.*, 2008; BORBA *et al.*, 2010), uma vantagem para fins comparativos. Os modelos em ratos são comumente empregados no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp, tendo sido empregados em diversos estudos experimentais (PINFILDI *et al.*, 2009; BORBA *et al.*, 2010; WOOD *et al.*, 2010; NISHIOKA *et al.*, 2012). Além disso, trata-se de animal de pequeno porte e de simples manuseio quando comparado a outros modelos com animais de porte maior.

O modelo experimental ideal para o estudo da cicatrização de pele é o porcino, sobretudo com relação a cicatrizes fibroproliferativas (ZHU *et al.*, 2007; RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA, 2008) pela semelhança do seu tecido cutâneo com o humano. Entretanto, é um animal que exige maior disponibilidade de espaço e recursos. A pesquisa experimental prévia com ratos pode abrir perspectivas para realização de estudos com porcos com delineamento mais específico, permitindo assim avaliar parâmetros histológicos do processo de cicatrização que não poderiam ser avaliados da mesma forma no humano.

Para a realização da ferida incisional, foram adotados alguns parâmetros como escolha da região, tipo de depilação, modelo de ferida e uso de gabaritos. A escolha da região dorsal do rato para realização do estudo foi baseada em estudos prévios como o de PINFILDI *et al.* (2005), REZENDE *et al.* (2007), BORBA *et al.* (2010), por se tratar de uma região de fácil acesso para os pesquisadores, além de evitar que o animal o alcance ou que faça autofagia na região da ferida.

A depilação digital foi o método adotado para remoção dos pelos da região dorsal dos ratos com base em diversos estudos, inclusive realizados no presente Programa de Pós-Graduação, como os de PINFILDI *et al.* (2005), LIEBANO *et al.* (2008), BORBA *et al.* (2010), NISHIOKA *et al.* (2012), entre outros. Embora essa técnica desencadeie um processo inflamatório maior, esse viés se aplica a todos os animais, não interferindo na obtenção e comparação dos resultados.

No que se refere ao modelo de ferida, o excisional é o mais utilizado para análise de infiltrado inflamatório pela técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE), além da contração da ferida (CORAZZA *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2008; ADAMSKAYA *et al.*, 2010; HEGDE *et al.*, 2011). Entretanto, no presente estudo foi estudada a ferida incisional, que é utilizada na prática clínica durante procedimentos cirúrgicos (YAZUKAWA *et al.*, 2007; AKYOL *et al.*, 2010; BORBA *et al.*, 2010), sobretudo na área de Cirurgia Plástica, o que motivou a escolha desse modelo de ferida. A ferida incisional utilizada talvez justifique o fato de que, na análise por HE, não tenha ocorrido variação dos níveis de infiltrado celular a despeito das doses de energia e dias de coleta, o que seria desejável clinicamente.

Com relação ao uso de gabaritos de acetato em diversas etapas da fase experimental, eles permitem realizar os procedimentos de modo

uniforme e reprodutível, minimizando o risco de erros de posicionamentos e medidas. A utilização de gabaritos em estudos experimentais como este é padrão das pesquisas realizadas no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp (PINLFILDI *et al.*, 2005; PINLFILDI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010; NISHIOKA *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante a ser observado no delineamento da pesquisa é o fato de que a literatura apresenta diversos estudos autocontrolados com fototerapia em cicatrização em pele de ratos, com duas ou mais feridas no mesmo animal, sendo uma(s) irradiada e outra(s) não (SILVA *et al.*, 2006; YASUKAWA, 2007; GÜNGÖRMÜS & AKYOL, 2009; AKYOL & GÜNGÖRMÜS, 2010). Isso vai de encontro ao possível efeito sistêmico da LLLT relatado por RODRIGO *et al.* (2009). Para evitar esse viés, neste trabalho foi utilizado grupo controle, no qual foi provocada a mesma ferida incisional dos grupos experimentais (descrita no delineamento), mas tendo sido exposto à simulação da LLLT, com a caneta desligada.

Seguindo a padronização dos procedimentos realizados, para aplicação de *laser* nos animais, foi utilizada a técnica pontual com contato e perpendicular à região irradiada, conforme observado nos estudos mais recentes com LLLT (PILFILDI *et al.*, 2008; WOOD *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2011; PECCIN *et al.*, 2012). Para assegurar que a caneta permanecesse nessas condições durante todo o período de irradiação, foi utilizado um suporte para apoio da caneta do *laser*. Importante notar que na prática clínica o fisioterapeuta segura a caneta, entretanto isso pode implicar em variação de posição do feixe de luz por conta da fadiga muscular que pode ocorrer quando o tempo de terapia é longo, como no caso do presente estudo.



Após a fase de irradiação dos animais, foi realizada a etapa de coleta de tecido para análise histoquímica por HE, imuno-histoquímica e de birrefringência (BORBA *et al.*, 2010; VIDAL *et al.*, 1987). Para esta última também foi utilizado gabarito e adotada técnica para fixação do tecido em borracha por meio de alfinetes. O tecido ficou imerso em formol tamponado por tempo determinado a fim de que a amostra (contendo pele e tecido cicatricial) não retraísse e permanecesse em boas condições para ser emblocada em parafina e cortada no micrótomo.

A histoquímica por HE é muito empregada nos estudos de cicatrização de pele, inclusive com LLLT (REZENDE *et al.*, 2007; GÜNGÖRMÜS & AKYOL 2009; AKYOL & GÜNGÖRMÜS 2010) por se tratar de técnica simples que permite avaliar diversos parâmetros do processo inflamatório nos tecidos estudados. Isso facilita a busca de pesquisas semelhantes e comparação de resultados.

Outras técnicas também são aplicadas para avaliação de colágeno tipo I e tipo III, como o *Picro Sirius* (WOOD *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011 ) ou o Tricômio de Masson utilizado por REZENDE *et al.*, (2007). Esta última, entretanto, permite apenas uma avaliação do tecido cicatricial como um todo e não diferencia os tipos de colágeno. Por outro lado, o *Picro Sirius* possibilita a quantificação de colágeno tipo I e tipo III, tendo sido empregado no piloto. Entretanto, optou-se pela imuno-histoquímica por se tratar de uma técnica que avalia separadamente os tipos de fibras colágenas destacando-as em tom castanho, o que descarta a possibilidade de sobreposição de cores durante a análise de imagem - diferente da técnica histoquímica de luz polarizada onde o colágeno tipo I é corado em vermelho e o tipo III em verde, possibilitando mistura dessas cores, o que compromete a quantificação por imagem. Outro obstáculo com relação à imuno-histoquímica foi a escassez de estudos que a tivessem empregado da

mesma forma que neste trabalho. Isso dificultou a realização de comparações na análise e discussão dos resultados.

A birrefringência é uma técnica que se utiliza das propriedades anisotrópicas do colágeno para avaliar seu alinhamento, sendo seu valor representado pelo retardo óptico (RO), em nm. Quanto maior o RO, melhor o alinhamento das fibras colágenas naquele tecido. Esse método de avaliação é muito empregado em tecidos abundantes em colágeno, como ligamentos e tendões (OLIVEIRA *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010; GOBBATO *et al.*, 2011), que possuem as fibras colágenas dispostas de modo paralelo, ao passo que na pele o colágeno é reticulado; entretanto essa diferença não inviabiliza a análise do RO na pele, uma vez que se trata do mesmo componente da matriz extracelular (MEC).

Os comprimentos de onda acima de 500 nm são amplamente utilizados para estimular a cicatrização, sobretudo nas faixas do vermelho do infravermelho (SILVA *et al.*, 2009). Sabe-se que o mecanismo de ação da fototerapia depende do comprimento de onda utilizado e da energia total ofertada (FAROUK *et al.*, 2007; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2013), que influenciam diretamente o metabolismo mitocondrial, agindo em cromóforos da membrana e da cadeia respiratória (KARU, 2005; BONATTI *et al.*, 2011) e modulando diversos mecanismos biológicos como proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais), síntese de colágeno e matriz extracelular (REZENDE *et al.*, 2008; GÜRGÖRMUS *et al.*, 2009; HEGDE *et al.*, 2011; AKYOL *et al.*, 2010).

Nesse sentido, há relatos na literatura, de estudos *in vitro*, de que o comprimento de onda infravermelho, além do efeito estimulatório no processo cicatricial, pode ainda exercer efeito inibitório (WEBB & DYSON, 2003; LEV-TOV *et al.*, 2013-a). Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que descrevessem a inibição celular *in*

*vivo* ou clinicamente, o que poderia ter relevância clínica no tratamento e prevenção de cicatrizes fibroproliferativas, caracterizadas pelo aumento da quantidade e expressão dos fibroblastos (HOCHMAN *et al.*, 2005). Esse fato motivou a escolha do comprimento de onda infravermelho no presente estudo.

Além do comprimento de onda, a quantidade de energia também é um fator preponderante na resposta celular. Um dos fatores que contribui para convergência e entendimento da quantidade de energia empregada no tecido é o parâmetro energia total (E), atualmente discutido e analisado em estudos com LLLT. Quando se discute energia total ou energia, considere-se que  $E = P$  (potência de saída em mW) x Tempo de aplicação (s), o que determina toda a energia entregue ao tecido, ou seja, representa a quantidade total de excitação que uma biomolécula pode efetivamente alcançar - no caso, a quantidade total de energia ofertada ao tecido (KARU, 2005; TUMILTY *et al.*, 2010). Em meio a tantos outros parâmetros a serem aplicados para que ocorra a resposta tecidual esperada, como densidade de energia (DE), densidade de potência (DP) e área de feixe, somados à diversidade de equipamentos e de descrição de metodologia dos estudos com fototerapia, foi preconizado neste trabalho o uso da energia total para fins comparativos com outras pesquisas.

Com relação aos parâmetros citados, é descrita a janela terapêutica, uma faixa de dose de energia considerada ideal para cicatrização com fins estimulatórios que, segundo Mc LEOAD *et al.* (2004), varia entre 0,3 e 1,5 J. A tabela de energia da WALT (*World Association of Laser Therapy*) é muito utilizada na padronização dos parâmetros de dosimetria de fototerapia na reparação tecidual. Ela não foi empregada no presente estudo por se tratar de doses empregadas em humanos. Além disso, essa organização não tem divulgado valores de referência para cicatrização de

feridas. As doses utilizadas foram baseadas nos estudos de Mc LEOAD *et al.* (2004), que realizaram uma revisão das doses de *laser* infravermelho aplicadas em cicatrização de tecidos, dentre eles, feridas cutâneas, cuja janela varia entre 0,3 a 1,5 J. Para o grupo baixa dose (GB) foi adotada, então, a dose mais alta da janela terapêutica (1,5 J) conforme empregado por REZENDE *et al.*(2007). Para o grupo alta dose (GA) empregou-se, por ponto, o dobro da maior dose encontrada na literatura, de 30 J (AL-WATBAN *et al.*, 2007), acima da maior dose encontrada em estudos *in vitro* até o início da fase experimental deste estudo, aplicada por HOURELD & ABRAHAMSE (2008).

## 6.2 Sobre os resultados

A partir dos resultados *in vitro* de HOURELD & ABRAHAMSE (2008) que verificaram inibição da proliferação de fibroblastos *in vitro* após irradiarem com 145 J, por duas vezes e com intervalo de 72h; o presente estudo preconizou o uso de uma energia maior por se tratar de um estudo *in vivo*, sendo 180J de energia total ofertada ao tecido por irradiação e durante 5 dias consecutivos. Ainda assim, não foi atingido o ponto de inibição com relação aos fibroblastos. Acreditava-se que a alta dosagem pudesse atingir o efeito inibitório descrito na curva de Arndt-Schutz (Anexo 2), principalmente com relação aos fibroblastos. Essa curva descreve que a resposta biológica necessita de uma energia mínima para ocorrer, aumentando proporcionalmente a partir daí (onde se enquadra a janela terapêutica) até atingir um pico e começar a declinar, desenhando uma parábola, reduzindo a resposta até atingir um efeito inibitório. É possível que o presente estudo tenha atingido o ponto da curva de declínio, correspondente ao ponto oposto da parábola em que não há resposta

celular. Isso justificaria os eventos inalterados do processo de cicatrização, com relação à proliferação de fibroblastos, angiogênese e tecido de granulação, que apresentaram valores reduzidos entre o 7º e 14º dias, o que ocorre normalmente nas etapas da cicatrização. São necessárias novas pesquisas com doses de energia maiores e/ou mais dias de aplicação, a fim de investigar o efeito inibitório *in vivo* observado com o mesmo comprimento de onda em estudos *in vitro*.

Essa redução da resposta entre os dias observados no presente estudo também foi relatada por GONÇALVES *et al.* (2010), que aplicaram *laser* infravermelho (830 nm) em feridas em pele de ratos em doses semelhante ao grupo GB deste estudo, com avaliações nos dias 4, 8, 16 e 20 após a realização da ferida. Houve aumento da resposta no 8º dia em relação ao 4º dia, mas não houve diferença entre os dias 16 e 20 em relação ao 8º. Essas diferenças talvez pudessem ter sido observadas no presente estudo se fossem realizadas coletas em um período mais curto.

Em contrapartida, REZENDE *et al.* (2007) utilizaram *laser* infravermelho (830 nm) em dose idêntica ao grupo GB (1,5 J) e de 3,36 J em cicatrização de pele de rato. As avaliações foram conduzidas nos dias 3, 7 e 14 com a técnica de coloração por HE. No 3º dia, houve aumento de capilares, fibroblastos e tecido de granulação, parâmetros que permaneceram aumentados no 7º e 14º dias em relação ao controle, diferentemente do presente estudo em que houve diminuição da quantidade de fibroblastos, vasos e tecido de granulação no 14º dia em relação ao 7º dia, independentemente da dose aplicada.

Entretanto, esses mesmos autores (REZENDE *et al.*, 2007) realizaram aplicação em dose única, ao passo que o presente estudo realizou 5 aplicações de *laser* durante 5 dias consecutivos. É descrito na literatura que a LLLT apresenta efeito cumulativo (HOURELD &

ABRAHAMSE, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2013). Sendo assim, mesmo na dose terapêutica (1,5 J) a LLLT foi aplicada por dias consecutivos e, por ser a mais alta dose da janela terapêutica, pode ter levado à saturação, fazendo com que a resposta biológica não ocorresse, tal como se não tivesse havido aplicação de LLLT. Curiosamente, o fato de a alta dosagem (60 J) não ter apresentado efeito inibitório nos leva a considerar a existência de uma janela (ampla, por sinal) de “não resposta”, ou janela “refratária”, que precederia a inibição.

AKYOL & GÜNGÖRMÜS (2010) realizaram irradiação com *laser* infravermelho (808 nm) em ferida incisional durante 5 dias, de forma semelhante ao empregado neste estudo, entretanto os autores só forneceram dados de DE ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) e tempo, inviabilizando o cálculo da energia total. Foi realizada análise histológica pela técnica de HE no 10º e 20º dias, tendo sido constatada redução do infiltrado inflamatório no 10º dia nas feridas irradiadas em relação ao controle. No presente estudo, essa variável permaneceu inalterada indiferentemente dos dias de coleta e das doses aplicadas.

A birrefringência de fibras colágenas é comumente avaliada em tendão (WOOD *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011), um tecido rico em colágeno e com valores de RO bem superiores aos encontrados na pele (SILVA *et al.*, 2006). Sabe-se que quanto maior o valor de RO, maior a birrefringência do colágeno e maior a sua organização no tecido conjuntivo (VIDAL, 1986).

A literatura é escassa em estudos que avaliem birrefringência de fibras colágenas em pele de ratos. SILVA *et al.* (2006) realizaram essa análise em cicatrização de queimadura em pele de rato após irradiarem as lesões com *laser* He-Ne. Foram coletadas amostras nos dias 3, 7, 10, 14 e 17 após a queimadura. Até o 14º dia os autores não observaram diferença

nos valores de RO nas lesões, diferentemente do presente estudo que observou diferenças nos valores de RO tanto no 7º como no 14º dias. Isso poderia decorrer do fato de que, no referido estudo, o modelo utilizado foi de queimadura, que, por gerar um dano tecidual maior do que a ferida incisional, demoraria mais tempo para atingir a fase de remodelamento. No 17º dia, SILVA *et al.* (2006) observaram valores mais elevados de RO nos grupos irradiados, o que corrobora com o presente estudo, que também obteve melhora na birrefringência das fibras colágenas independentemente da energia aplicada. Com base nos resultados do estudo citado, que utilizou LLLT vermelha, e nos do presente estudo, que utilizou a infravermelha, e considerando-se que ambos verificaram aumento do RO, pode-se inferir que a LLLT tem efeito positivo no alinhamento das fibras de colágeno e parece antecipar a fase de remodelamento.

Esse achado pode ser clinicamente interessante no que diz respeito à qualidade e aspecto da cicatriz, que são de suma importância em Cirurgia Plástica. Assim, tendo em vista que a LLLT aplicada no presente estudo não alterou a proliferação de fibroblastos, mas aumentou o RO, ela poderia ser objeto de futuros estudos clínicos para tratamento e prevenção de cicatrizes fibroproliferativas, como queiloide e cicatriz hipertrófica, que apresentam tecido cicatricial totalmente desorganizado (HOCHMAN *et al.*, 2005).

SILVA *et al.* (2006) também avaliaram os valores de RO na pele, que apresenta valores mais elevados em relação ao tecido cicatricial, o que vai de encontro com o presente estudo que avaliou o RO da pele adjacente à cicatriz. Entretanto, espera-se que a pele apresente melhor alinhamento das fibras de colágeno do que o tecido lesado. O presente estudo também avaliou a birrefringência do colágeno da pele adjacente em todos os grupos, tendo sido observado o mesmo comportamento da cicatriz: RO mais

elevado nos grupos irradiados, independentemente da dose e do dia de coleta de tecido.

Assim, o achado com relação ao RO, mais elevado nos grupos irradiados, denota um aspecto clínico importante, uma vez que quanto melhor o alinhamento das fibras de colágeno, melhor o aspecto e a qualidade da cicatriz. Esse fato tem ampla aplicabilidade clínica não só em Cirurgia Plástica, mas em qualquer procedimento cirúrgico que implique em incisões na pele. Acrescente-se a isso a influência do aspecto da cicatriz sobre a qualidade de vida do paciente, como descrito por FURTADO *et al.* (2009). Abre-se, aqui, uma perspectiva para estudos clínicos de aplicação de *laser* infravermelho no pós-operatório de incisões cirúrgicas com intuito de avaliar o aspecto da cicatriz. Além disso, o fato de o RO ter sido maior também na pele adjacente abre margem para que se considere uma aplicação pré-operatória da LLLT infravermelha seguida por avaliação do tecido irradiado e excisado durante a cirurgia, e acompanhamento do processo de cicatrização.

A partir da análise de imuno-histoquímica de fibras colágenas, verificou-se uma redução muito significativa da quantidade de colágeno, sobretudo do tipo I. Esse tipo de avaliação é pouco empregado para pele, o que dificulta comparações. BORBA *et al.* (2010) utilizaram essa mesma técnica de imuno-histoquímica de fibras colágenas para avaliar a cicatrização de ferida após aplicação de corrente elétrica pré-incisional em pele de ratos. Os autores observaram um aumento de colágeno tipo III no 7º dia, diferentemente do que foi encontrado no presente estudo, onde se observou diminuição do colágeno III apenas no GA e no 14º dia. A comparação de ambos os resultados demonstra que os recursos biofísicos, embora exerçam influência na MEC, podem apresentar peculiaridades próprias nos efeitos durante o processo de cicatrização. Clinicamente essas



informações são muito importantes na elaboração de protocolos de tratamentos de feridas.

GONÇALVES *et al.* (2013) avaliaram o efeito da LLLT de 830 na cicatrização de ferida excisional em pele de ratos. Os autores aplicaram uma energia total de 36,9 J em um grupo e 110,7 J e analisaram fibras colágenas tipo I e tipo III por microscopia de polarização (*Picro sirius*). Verificou-se que houve aumento colágeno tipo III em todos os tempos observados, sobretudo com a dose menor. Esses dados diferem do presente estudo, que constatou redução do colágeno tipo III na dose total de energia do GA (180 J) no 14º dia. Com relação ao colágeno tipo I, o autores observaram que a quantidade foi maior no 7º e no 14º dia, o que diverge desta pesquisa em que a quantidade de colágeno tipo I foi significativamente menor em ambos dias de coleta. Estes resultados corroboram com o efeito cumulativo que a LLLT pode exercer nos tecidos quando aplicada não só em altas doses, mas também em dias consecutivos (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; ROCKIND *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010).

Na literatura é relatado que a síntese de matriz extracelular é inversamente proporcional ao comprimento de onda e energia ofertada (MENDEZ *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2004) o que corrobora com os resultados deste trabalho que investigou o efeito da LLLT no espectro infravermelho (comprimento de onda maior) no principal componente da matriz extracelular e verificou a redução da quantidade de colágeno tipo I e tipo III.

Sendo assim, a relevante redução do colágeno constatada nesta pesquisa corrobora com os estudos que relatam o efeito dose-dependente e cumulativo da LLLT (HAWKINS & ABRAHAMSE; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2010), em que não foram observadas diferenças em nível celular, mas na síntese de colágeno, inibida

diante da alta dosagem e dias consecutivos de aplicação da irradiação. Esse achado pode ser relevante para tratamento de cicatrizes hipertróficas e quelóide, entretanto quando se pretende estimular a síntese de MEC, é conveniente considerar não só a dose aplicada, mas também os intervalos entre cada sessão de laserterapia.

Observa-se no presente estudo que os resultados obtidos foram mais expressivos com relação ao colágeno, tanto na birrefringência como na análise imuno-histoquímica. O aumento do RO frente à redução de fibras colágenas, sobretudo do tipo I, poderia levantar a hipótese de um resultado falso positivo para a birrefringência. Entretanto, estudos realizados com fototerapia de baixa intensidade em tendões tanto no espectro vermelho como infravermelho revelaram um aumento do RO (WOOD *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011). Assim, nesta pesquisa, observou-se redução da quantidade do colágeno, além de melhor alinhamento, reforçando a perspectiva de estudos que envolvam prevenção e tratamento de cicatrizes fibroproliferativas.

Com base nos resultados aqui observados, é possível afirmar que a LLLT no espectro infravermelho exerce forte influência nos mecanismos de síntese ou talvez de degradação de colágeno, uma vez que não é possível esclarecer se houve inibição de síntese ou aumento de degradação. Assim, a realização de estudos com o comprimento de onda aqui adotado torna-se muito relevante em outras células e organelas celulares envolvidas nesses processos, como neutrófilos, que também sintetizam colagenase, ou retículo endoplasmático rugoso, abundante em fibroblastos e responsável pela síntese de MEC. A avaliação de macrófagos seria interessante, pois, além de serem importantes células do processo de cicatrização, também modulam fibroblastos pela liberação de citocinas como TGF- $\beta$ , PDGF, IL-1 $\beta$  induzindo a síntese de colágeno (BARRON & WYNN, 2011;

WYNN & RAMALINGAM, 2012), participando, ainda, da degradação do excesso de MEC. Assim, seria de grande valia o estudo da LLLT na possível ativação de macrófagos no tratamento e prevenção de fibroses, inclusive cicatriciais.

### 6.3 Perspectivas

- Realização de estudos experimentais com delineamento semelhante em porcos;
- Estudos experimentais com outras variações de parâmetros como doses, tempo, dias, aplicação única e aplicação múltipla;
- Estudos experimentais com avaliação de outros elementos da cicatrização como macrófagos, neutrófilos, miofibroblastos, matriz extracelular e mecanismos de sinalização;
- Estudos com LLLT que avaliem organelas celulares como retículo endoplasmático rugoso e mecanismos de síntese de MEC e collagenase;
- Estudos experimentais com outros comprimentos de onda em alta dosagem (superiores a 60 J) para avaliação de birrefringência e quantificação de colágeno tipo I e tipo III;
- Estudos clínicos com LLLT no espectro infravermelho com avaliação pré e pós-operatória;
- Estudos clínicos em pacientes portadores de cicatrizes fibroproliferativas no pré-operatório: realização de LLLT infravermelha para avaliação histológica da pele e da cicatriz a serem excisadas.

- Estudos clínicos com aplicação de LLLT infravermelha em cicatrizes fibroproliferativas.

## **CONCLUSÃO**

## **7. CONCLUSÃO**

A LLLT nas doses alta (60 J) e baixa (1,5 J):

1. Foi eficiente no aumento do RO das fibras colágenas da cicatriz e da pele adjacente na cicatrização em pele de ratos.
2. Não alterou a intensidade do infiltrado inflamatório entre o 7º e 14º dia.
3. Apresentou redução do número de fibroblastos, vasos e tecido de granulação no 14º dia em relação ao 7º dia.
4. Apresentou redução do colágeno tipo I no 7º e 14º dia
5. Na dose de 60 J apresentou redução de colágeno tipo III no 14º dia

## **REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

Akyol U, Güngörmüş M. The effect of low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):51-5.

Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, Kauffman CL, Davison SP. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jan;117(1):286-300.

Alster TS. Improvement of erythematous and hypertrophic scars by the 585nm flashlamp-pumped pulsed dye laser. *Ann Plast Surg.* 1994 Feb;32(2):186-90.

Al-Watban FAH, Zhang XY, Andres BL. Low-Level Laser Therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different Lasers. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):72-7.

Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 May;300(5):G723-8.

Bednarska K, Rózga B, Kolodziejczyk K, Szosland D, Leyko W, Bryszewska S. Effect of low-power red light laser irradiation on the viability on the human skin fibroblast. *Radiot Envir Biophys.* 1998 Oct;37(3):215-7.

Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, and Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Jul;102(1):124–31.

Bock O, Schmid-Ott G, Malewski P, Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring. *Arch Dermatol Res.* 2006 Apr; 297(10):433-8.

Bonatti S, Hochman B, Tucci-Viegas VM, Furtado F, CE Pinfildi, Pedro AC, Ferreira LM. In vitro effect LED (Light Emitting Diode) of 470 nm in keloid fibroblasts. *Acta Cir Bras.* 2011 Feb;26(1):25-30.

Borba GC, Hochman B, Liebano RE, Enokihara MM, Ferreira LM. Does preoperative electrical stimulation of the skin alter the healing



process? *J Surg Res.* 2011 Apr;166(2):324-9.

Bouzari N, Davis SC, Nouri K. Laser treatment of keloids and hypertrophic scars. *Intern J Dermatol.* 2007 Jan; 46(1):80-8.

Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Brafa A, Campa A, Calabrò M, Campana M, D'Aniello C. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. *In Vivo.* 2010 Mar-Apr;24(2):223-6.

Chen CH, Tsai JL, Wang YH, Lee CL, Chen JK, Huang MH. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. *J Orthop Res.* 2009 May;27(5):646-50.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):102-6.

Costa MS, Pinfildi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy with output power of 30 mW and 60 mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):57-61.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):514-25.

Ennis WJ, Valdes W, Gainer M, Meneses P. Evaluation of clinical effectiveness of MIST ultrasound therapy for the healing of chronic wounds. *Adv Skin Wound Care.* 2006 Oct;19(8):437-46.

Ferreira ACB, Hochman B, Furtado F, Bonatti S, Ferreira LM. Keloids: a new challenge for nutrition. *Nut Rev.* 2010 Jul;68(7):409-17.

Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc.* 2009 Sep;81(3):623-9.

Furtado F, Hochman B, Ferrara SF, Dini GM, Nunes JM, Juliano Y, Ferreira LM. What factors affect the quality of life of patients with keloids? *Rev Assoc Med Bras.* 2009 Nov-Dec;55(6):700-4.

Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes T, Longauer F, Sabo J. Histological assessment of the effect of Laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Aug;24(4):480-8.

Garcia VG, Macarini VC, de Almeida JM, Bosco AF, Nagata MJ, Okamoto T, Longo M, Theodoro LH. Influence of low-level laser therapy on wound healing in nicotine-treated animals. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):437-4.

Gonçalves RV, Mezêncio JM, Benevides GP, Matta SL, Neves CA, Sarandy MM, Vilela EF. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Apr;43(4):350-5.

Gonçalves RV, Novaes RD, Cupertino Mdo C, Moraes B, Leite JP, Peluzio Mdo C, Pinto MV, da Matta SL. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):383-90.

Güngörmüş M, Akyol U. The effect of gallium-aluminum-arsenide 808-nm low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):895-9.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008 May;453:314-21.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):705-14.

Hegde VN, Prabhu V, Rao SB, Chandra S, Kumar P, Satyamoorthy K, Mahato KK. Effect of laser dose and treatment schedule on excision wound healing in diabetic mice. *Photochem Photobiol.* 2011 Nov-Dec;87(6):1433-41.

Hochman B, Pilfildi CE, Nishioka MA, Furtado F, Bonatti S, Monteiro PKP, Antunes AS, Quieregatto PR, Liebano RE, Chadi G, Ferrerira LM. Low level laser therapy and light emitting diode in neuropeptides Sp and cgrp secretion in healthy skin in rats. *Laser Med Sci.* 2013 [*in press*].

Hochman B, Vilas Boas FC, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. *Acta Cir Bras.* 2005 May-Jun; 20(3):200-12.

Hourelid NN, Abrahamse H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med Sci.* 2008 Jan;23(1):11-8.

Kandolf-Sekulovic L, Kataranovski M, Pavlovic MD. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003 Aug;19(4):203–12.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2005 Nov 1;81(2):98-106

Kavros SJ, Miller JL, Hanna SW. Treatment of ischemic wounds with noncontact, low-frequency ultrasound: the Mayo clinic experience, 2004-2006. *Adv Skin Wound Care*. 2007 Apr;20(4):221-6.

Kirkwood BR, Sterne JA. *Essential medical statistics*. 2 ed. Oxford: Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006. 502p.

Köse O, Waseen A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? *Dermatol Surg*. 2008 Mar; 34(3):336-46.

Lev-Tov H, Brody N, Siegel D, Jagdeo J. Inhibition of fibroblast proliferation in vitro using low-level infrared light-emitting diodes. *Dermatol Surg*. 2013-a Mar;39(3Pt1):422-5.

Lev-Tov H, Mamalis A, Brody N, Siegel D, Jagdeo J. Inhibition of fibroblast proliferation in vitro using red light-emitting diodes. *Dermatol Surg*. 2013-b; Aug;39(8):1167-70

Liebano RE, Abla LE, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on the viability of ischemic skin flaps in the rat: an amplitude study. *Wound Repair Regen*. 2008 Jan-Feb;16(1):65-9.

Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, de Haan RJ. Wound healing in cell studies and animal model experiments by Low Level Laser Therapy; were clinical studies justified? a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2002;17(2):110-34.

Mandelbaum SH, Santis EP, Mandelbaum M. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources Part I. *An bras Dermatol*. 2003;78(4):393-410.

Martínez-Rodríguez A, Bello O, Fraiz M, Martínez-Bustelo S. The effect of alternating and biphasic currents on humans' wound healing: a

literature review. *Int J Dermatol*. 2013 Jun 20 [Epub ahead of print].

McLeod IA. Low level laser therapy in athletic training. *Athl Ther Today*. 2004;17-21.

Mendez TMTV, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Nascimento PM, Ramalho LMP. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg*, 2004;22:19–25.

Moore P, Ridgway TD, Rgbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect wavelenght on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Laser Surg Med*. 2005 Jan;36(1):8-12.

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

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4nd ed. Illinois: Richard D. Irwing. (1996). 1408p.

Neves MA, Pinfildi CE, Wood VT, Gobbato RC, da Silva FM, Parizotto NA, Hochman B, Ferreira LM. Different power settings of LLLT on the repair of the calcaneal tendon. *Photomed Laser Surg*. 2011 Oct;29(10):663-8.

Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci*. 2012 Sep;27(5):1045-50.

Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia EB, Ferreira LM. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):271-6.

Peccin MS, Renno AC, de Oliveira F, Giusti PR, Ribeiro DA. Helium-neon laser improves skin repair in rabbits. *J Cosmet Laser Ther*. 2012 Dec;14(6):286-9.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium–Neon laser in viability of random skin flap in rats. *Laser Surg Med*. 2005

Jul;37(1):74-7.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MM, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):337-43

Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Effect of application site of low-level laser therapy in random cutaneous flap viability in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009 Jun;27(3):411-6

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Ondontol Bras.* 2003 Oct-Dec;17(4):307-13.

Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res.* 2008 Mar-Apr;29(2):363-8.

Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez Sc, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2007 Jun;87(3):145-53.

Robles DT, Berg D. Abnormal wound healing: keloids. *Clin Dermatol* 2007 Jan-Fev;25(1):26-32.

Rochkind S, El-Ani D, Nevo Z, Shahar A. Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy. *Lasers Surg Med.* 2009 Apr;41(4):277-81.

Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JB, de Oliveira MG. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):929-35

Schindl A, Merwald LS, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 2003 Fev;148(2):334-6.

Shaffer JJ, Taylor SC, Cook-Bolden F. Keloidal scars: a review with a critical look at therapeutic options. *J Am Acad Dermatol.* 2002 Feb;46:S63-97.

Shi-Yau Y, Jen-Hwey C, Shiaw-Der Y, Yu-Chen H, Wing-Yiu L, Chew-

- Wun W. Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. *J Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006 Apr; 22(2):78-86.
- Shu B, Wu Z, Hao L, Zeng D, Feng G, Lin Y. Experimental study on He-Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. *Chin J Traumatol.* 2002 Aug;5(4):246-9.
- Silva DFT, Vidal BC, Zezell DM, Zorn TM, Núñez SC, Ribeiro MS. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. *J Biomed Opt.* 2006 Mar-Apr;11(2):024002.
- Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):125-31.
- Tacani PM, Liebano RE, Pinfildi CE, Gomes HC, Arias VE, Ferreira LM. Mechanical stimulation improves survival in random-pattern skin flaps in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2010 Dec;36(12):2048-56.
- Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):3-16.
- Vidal BC. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Mol Biol.* 1986;5:527-35
- Vinck EM; Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced emitting diode and low power laser irradiation. *Laser Med Sci.* 2003;18(2):95-9.
- Webb C, Dyson M, Lewis WHP. Stimulatory effect of 660nm of low level laser energy on hypertrophic scars: possible mechanism for increase cells counts. *Laser Surg Med.* 1998;22(5):294-301.
- Webb C, Dyson M. The effect 880 nm of low level laser energy on human fibroblasts: a possible role in hypertrophic wound healing. *J Photoch Photobiol Biol.* 2003 Apr;70(1):39-44.
- Wood V, Pinfild C, Neves M, Parizotto N, Hochman B, Ferreira L. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Laser Surg Med.*

2010 Aug;42(6):559-65.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012 Jul 6;18(7):1028-40.

Yasukawa A, Hruji H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci.* 2007 Aug;69(8):799-806.

Zhu KQ, Carrouger GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH. Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen.* 2007 Sep-Oct;15 Suppl 1:S32-9.

## Apêndice 1

### Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa:



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de novembro de 2008.  
**CEP 1301/08**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) SILVILENA BONATTI  
Co-Investigadores: Bernardo Hochman ( Orientador), Fabianne Furtado, Lydia Masako Ferreira  
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Laser infravermelho (830nm) em cicatrização em pele de ratos**”.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria C- estudo crônico.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica.

**OBJETIVOS:** Investigar o efeito do laser infravermelho de baixa potência na inibição da cicatrização em pele de ratos..

**RESUMO:** Estudo com ratos Wistar. Anestésico: quetamina e xilazina. Analgésico: tramadol. Eutanásia: superdosagem de anestésico. Serão utilizados 96 ratos distribuídos em 8 grupos: O grupo simulados(GS) será submetido à realização de incisão cutânea cirúrgica e à simulação delaserterapia com a caneta de laser desligada . Haverá 3 grupos experimentais ( GEA, GEB e GEC), distribuídos em 6 subgrupos que serão submetidos à realização de ferida cutânea e à aplicação de laser infravermelho de maneira pontual, mediante uso de gabarito. Será realizada irradiações com laser infravermelho a cada 24 horas, sendo a primeira até cinco minutos após o ato cirúrgico. Os animais serão submetidos à eutanásia no 4º e 8º dia após a incisão cirúrgica. Será coletado tecido para análise histológica e histomorfométrica.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** A maior parte dos estudos com laser de baixa intensidade foi realizada com fins estimulatórios na cicatrização. O efeito inibitório, observado em alguns estudos, poderia ter diversas aplicações clínicas. Entretanto, não há estudos especificamnetne direcionados para verificar o efeito inibitório do laser na cicatrização in vivo..

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos a serem realizados, utilizando métodos anestésicos e de eutanásia adequados.

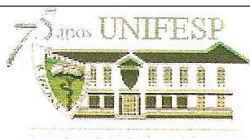
**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo.

**CRONOGRAMA:** 12 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 2/11/2009 e 2/11/2010.





Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

## Apêndice 2

Randomização dos animais:

**A Randomization Plan**  
from  
**<http://www.randomization.com>**

21.	GA7	_____
22.	GB7	_____
23.	GB14	_____
24.	GB14	_____
25.	GB7	_____
26.	GB7	_____
27.	GB7	_____
28.	GA14	_____
29.	GB7	_____
30.	GB7	_____
31.	GA14	_____
32.	GA7	_____
33.	GB7	_____
34.	GA7	_____
35.	GA14	_____
36.	GA14	_____
37.	GA7	_____
38.	GB14	_____
39.	GB7	_____
40.	GB14	_____
41.	GB7	_____
42.	GA7	_____
43.	GB14	_____
44.	GA7	_____
45.	GA14	_____
46.	GA14	_____
47.	GB14	_____
48.	GB14	_____
49.	GA7	_____
50.	GB14	_____
51.	GA7	_____
52.	GA14	_____
53.	GB7	_____
54.	GA7	_____
55.	GB14	_____
56.	GA14	_____
57.	GA14	_____
58.	GA7	_____
59.	GA14	_____
60.	GB14	_____

40 subjects randomized into 1 block  
To reproduce this plan, use the seed 21123  
Randomization plan created on Fri Jul 13 2012 00:12:51 GMT-0300 (Hora oficial do Brasil)

22/03/12

**A Randomization Plan**  
from  
**<http://www.randomization.com>**

1. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
2. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
3. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
4. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
5. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
6. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
7. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
8. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
9. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
10. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
11. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
12. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
13. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
14. \_\_\_\_\_
  - GS7

03/12

- GS14
- 15. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
- 16. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
- 17. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7
- 18. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
- 19. \_\_\_\_\_
  - GS7
  - GS14
- 20. \_\_\_\_\_
  - GS14
  - GS7

20 subjects randomized into 2 blocks  
To reproduce this plan, use the seed 17590  
Randomization plan created on Thu Mar 22 2012 07:58:47 GMT-0300 (Hora oficial do Brasil)

03/12

**A Random Permutation**  
from  
**<http://www.randomization.com>**

9  
13  
20  
5  
6  
1  
14  
2  
18  
10  
16  
19  
7  
3  
4  
15  
8  
17  
11  
12

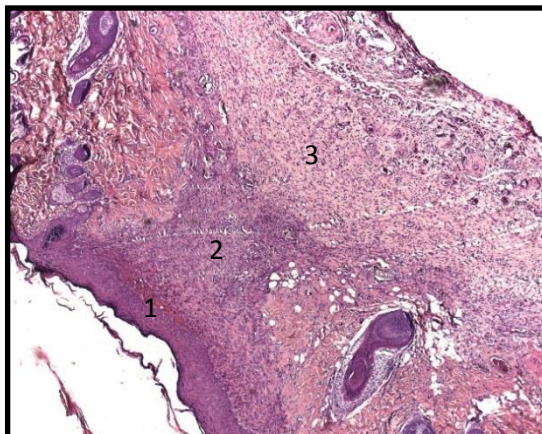
To reproduce this permutation, use the seed 11009  
Random permutation generated on Thu Mar 22 2012 08:00:11 GMT-0300 (Hora oficial do Brasil)

**Apêndice 3**

Animal	Cor	Hora início	Hora término
R34	branco	10:00	10:40
R53	vermelho	10:20	11:00

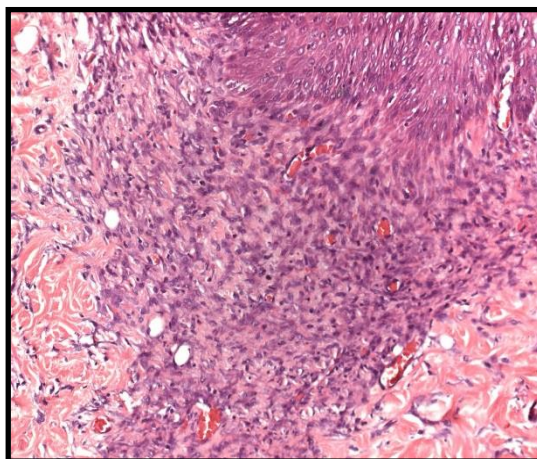
Exemplo da identificação das amostras por meio dos alfinetes coloridos enquanto permaneceram imersas em formol, antes de ser alojada nas grades K-7.

## Apêndice 4



Fotomicrografia de lâmina corada com HE.  
Aumento de 50X.

1. Epiderme
2. Derme
3. Pânículo carnoso



Fotomicrografia de lâmina corada com HE.  
Aumento de 400X em que foi realizada a  
avaliação, na região central entre epiderme e  
pânículo carnoso.

## Apêndice 5

Randomização da pele adjacente a ser submetida à avaliação de birrefringência de fibras colágenas. Lado direito ou esquerdo da cicatriz.

1/13

**A Randomization Plan**  
from  
**<http://www.randomization.com>**

1. Direita \_\_\_\_\_
2. Direita \_\_\_\_\_
3. Direita \_\_\_\_\_
4. Direita \_\_\_\_\_
5. Direita \_\_\_\_\_
6. Esquerda \_\_\_\_\_
7. Esquerda \_\_\_\_\_
8. Esquerda \_\_\_\_\_
9. Direita \_\_\_\_\_
10. Direita \_\_\_\_\_
11. Esquerda \_\_\_\_\_
12. Esquerda \_\_\_\_\_
13. Esquerda \_\_\_\_\_
14. Esquerda \_\_\_\_\_
15. Direita \_\_\_\_\_
16. Esquerda \_\_\_\_\_
17. Direita \_\_\_\_\_
18. Esquerda \_\_\_\_\_
19. Direita \_\_\_\_\_
20. Direita \_\_\_\_\_
21. Direita \_\_\_\_\_
22. Esquerda \_\_\_\_\_
23. Direita \_\_\_\_\_
24. Direita \_\_\_\_\_
25. Esquerda \_\_\_\_\_
26. Esquerda \_\_\_\_\_
27. Direita \_\_\_\_\_
28. Esquerda \_\_\_\_\_
29. Esquerda \_\_\_\_\_
30. Esquerda \_\_\_\_\_
31. Esquerda \_\_\_\_\_
32. Direita \_\_\_\_\_
33. Esquerda \_\_\_\_\_
34. Esquerda \_\_\_\_\_
35. Direita \_\_\_\_\_
36. Esquerda \_\_\_\_\_
37. Direita \_\_\_\_\_
38. Direita \_\_\_\_\_
39. Esquerda \_\_\_\_\_
40. Direita \_\_\_\_\_
41. Direita \_\_\_\_\_
42. Direita \_\_\_\_\_
43. Esquerda \_\_\_\_\_
44. Direita \_\_\_\_\_
45. Direita \_\_\_\_\_
46. Esquerda \_\_\_\_\_
47. Esquerda \_\_\_\_\_
48. Direita \_\_\_\_\_
49. Direita \_\_\_\_\_
50. Esquerda \_\_\_\_\_
51. Esquerda \_\_\_\_\_
52. Esquerda \_\_\_\_\_
53. Direita \_\_\_\_\_
54. Esquerda \_\_\_\_\_

1/2



00013

- 55. Direita \_\_\_\_\_
- 56. Esquerda \_\_\_\_\_
- 57. Esquerda \_\_\_\_\_
- 58. Direita \_\_\_\_\_
- 59. Esquerda \_\_\_\_\_
- 60. Direita \_\_\_\_\_

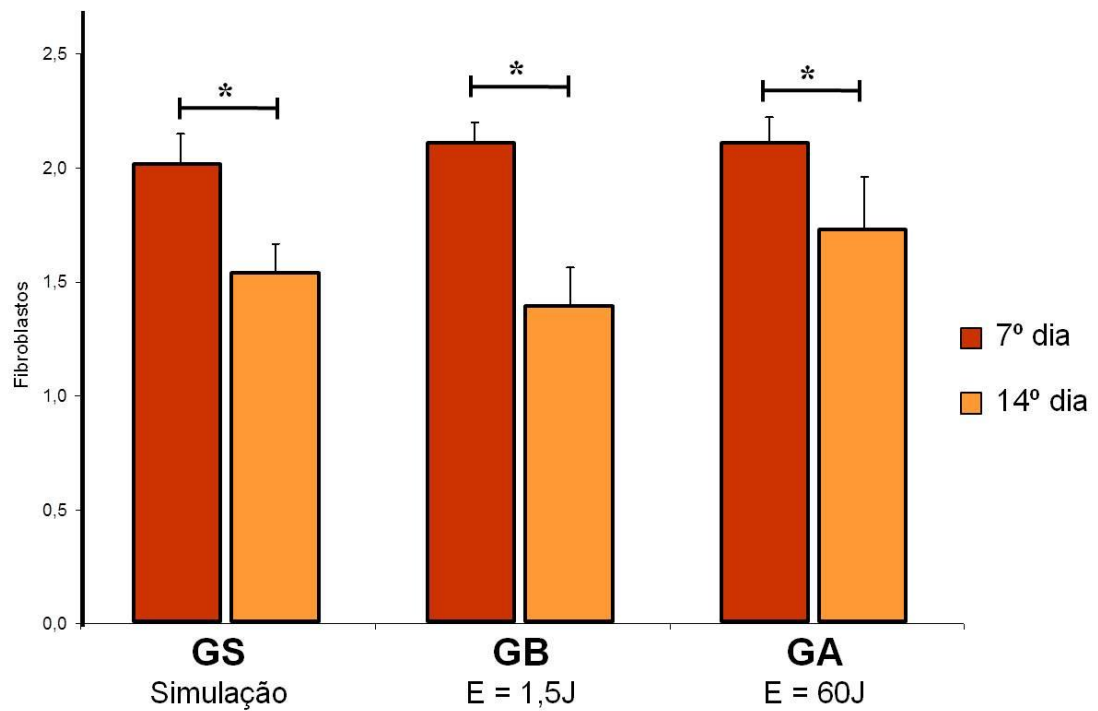
60 subjects randomized into 2 blocks

To reproduce this plan, use the seed 20068

Randomization plan created on Wed Jan 09 2013 17:05:20 GMT-0300 (Hora oficial do Brasil)

## Apêndice 6

Gráfico para representação da avaliação de fibroblastos, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.

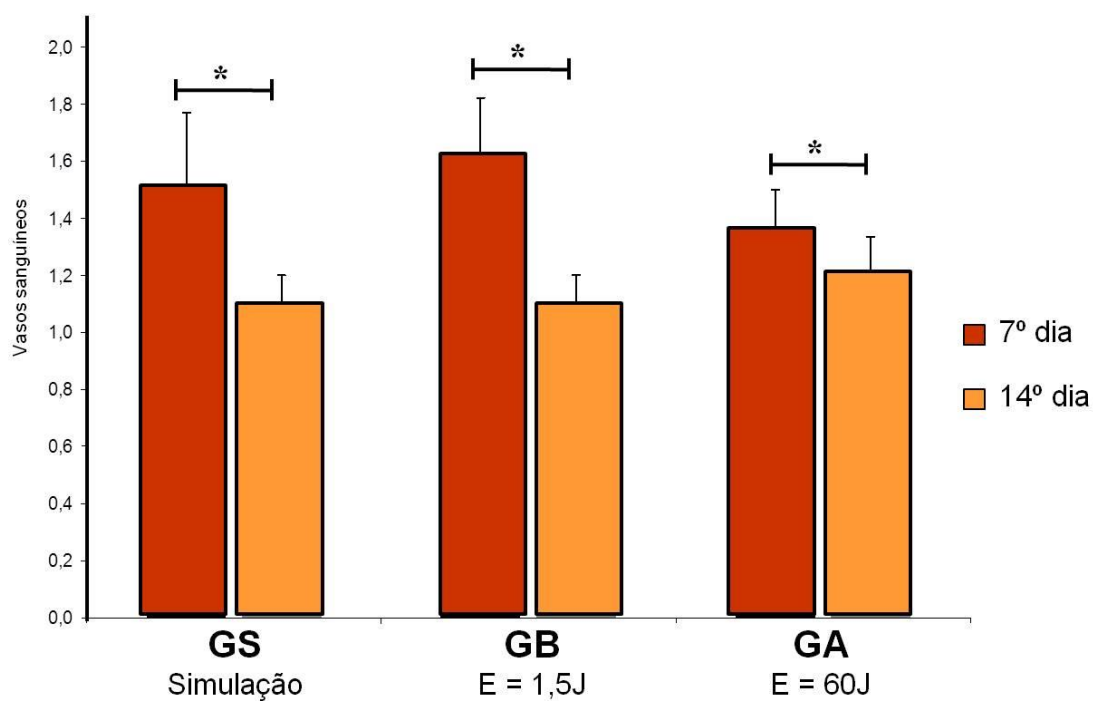


\*  $p < 0,05$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 7

Gráfico para representação da avaliação de vasos sanguíneos, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.

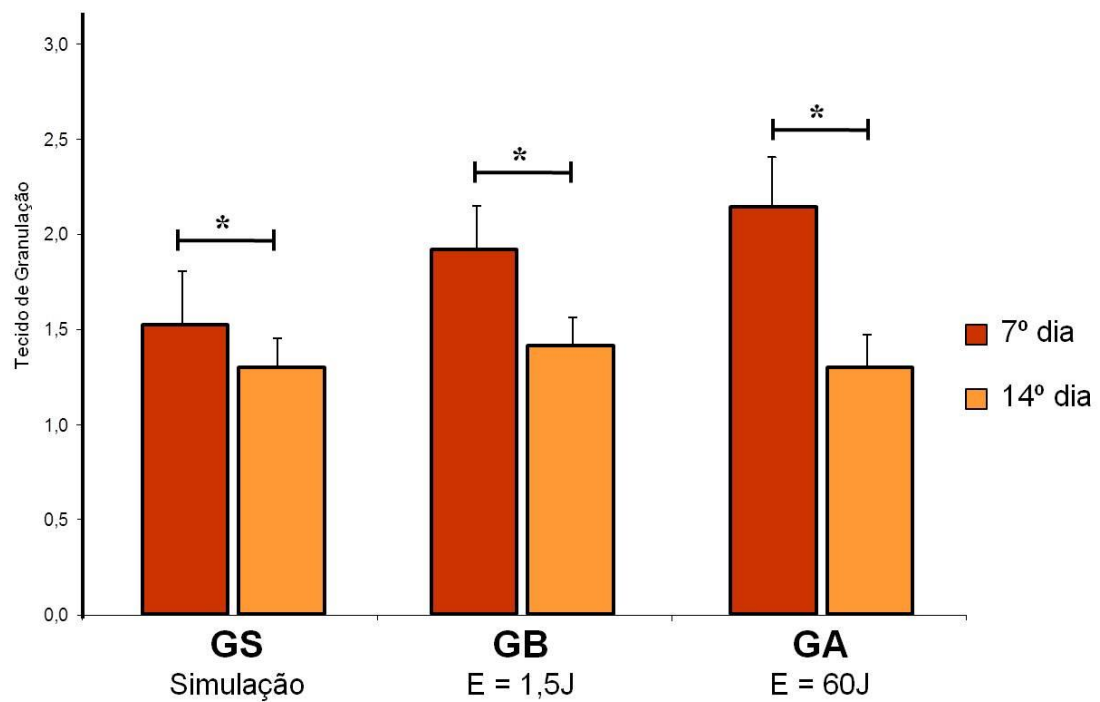


\*  $p < 0,05$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 8

Gráfico para representação da avaliação de tecido de granulação, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.

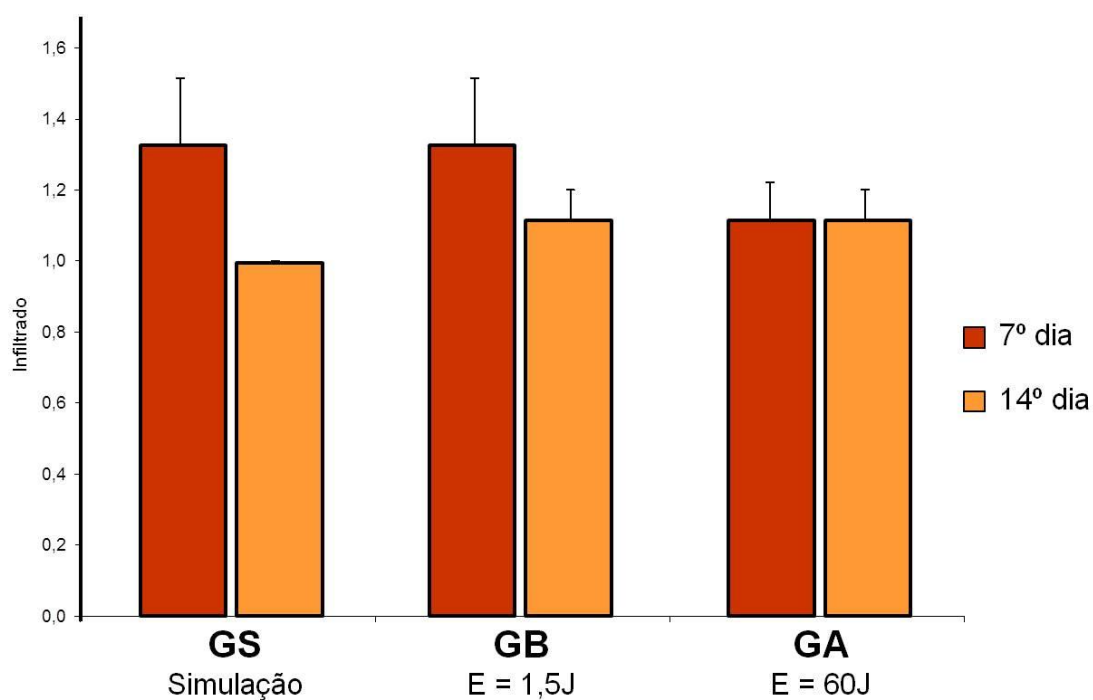


\*  $p < 0,05$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 9

Gráfico para representação da avaliação de infiltrado inflamatório, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.

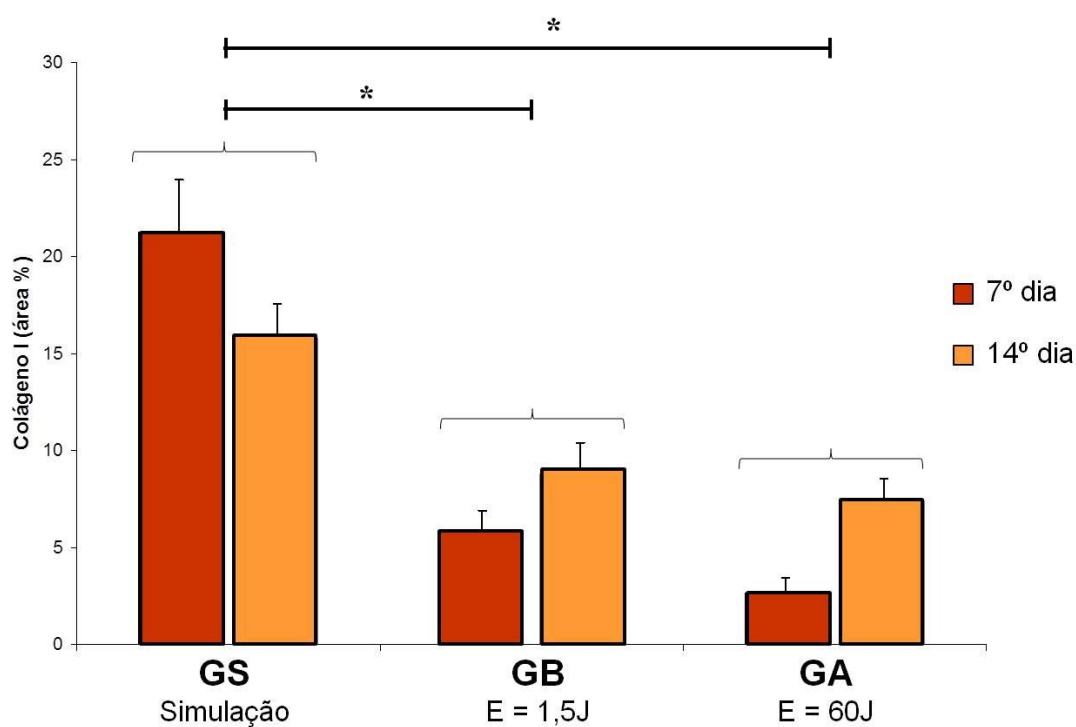


\*  $p > 0,05$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 10

Gráfico para representação da avaliação de colágeno tipo I, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.

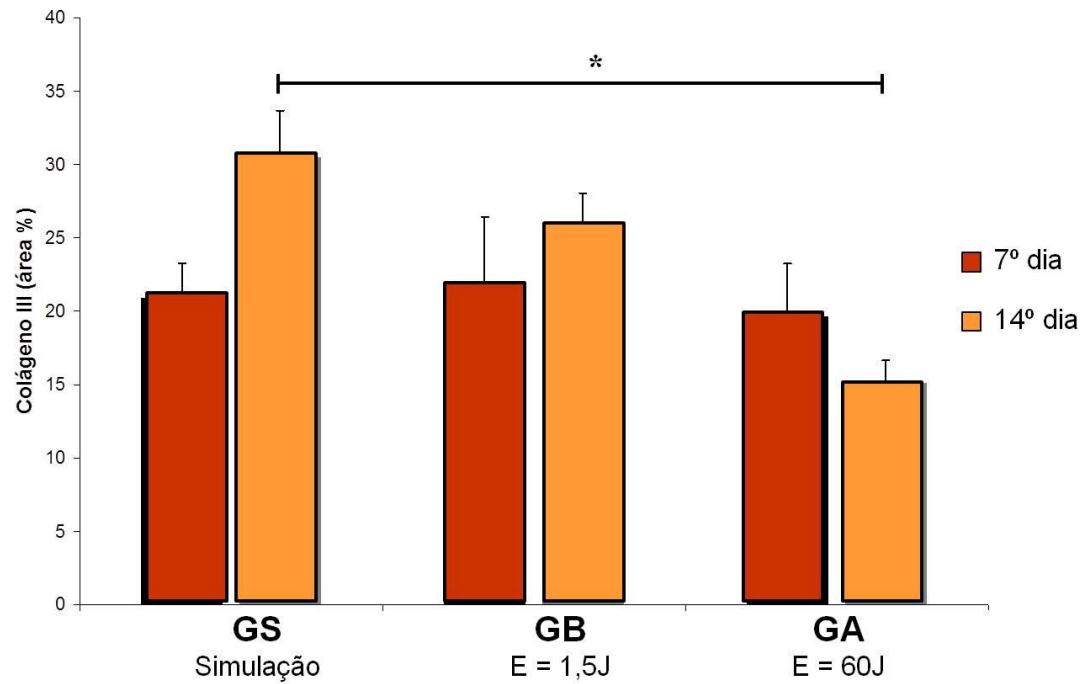


\*  $p < 0,001$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 11

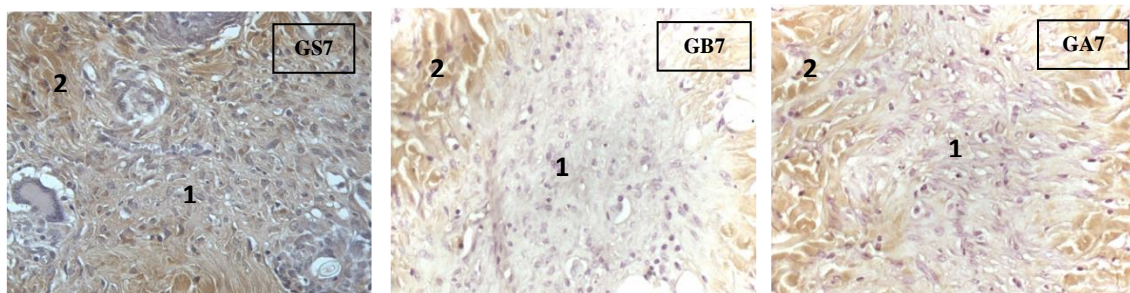
Gráfico para representação da avaliação de colágeno tipo III, com valores médios e erros padrões, segundo grupos e dias de coleta.



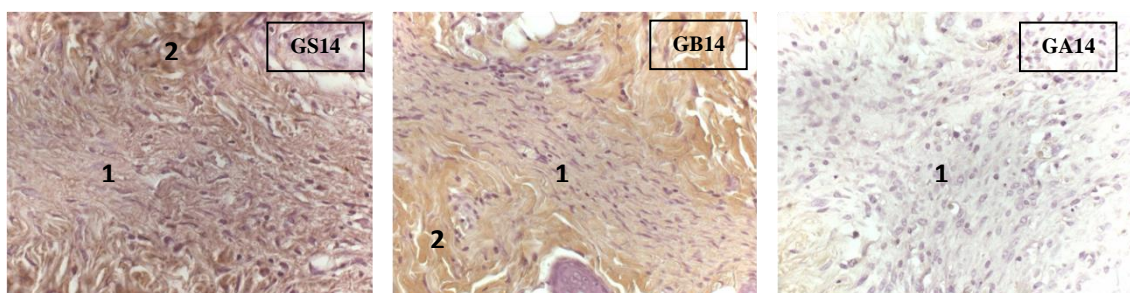
\*  $p = 0,042$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 12



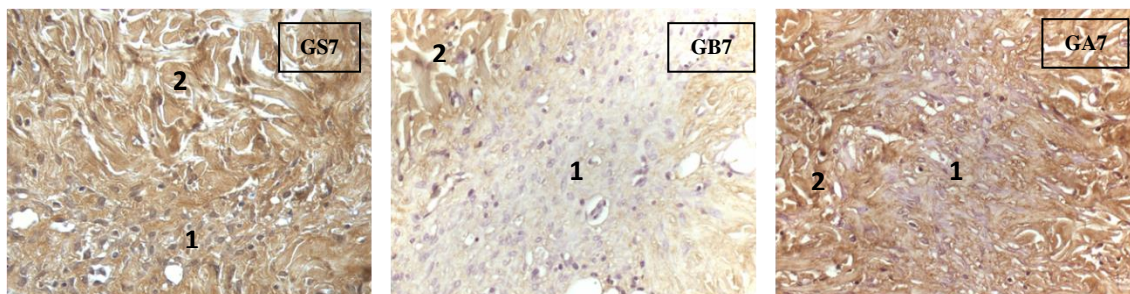
Fotomicrografias de imunohistoquímica de colágeno tipo I nos grupos com amostras coletadas no 7º dia (GS7, GB7, GA7). Aumento de 400 X. 1: Colágeno tipo I em região de tecido cicatricial; 2: Colágeno tipo I em região de pele adjacente. Há maior presença de infiltrado inflamatório corado pela Hematoxilina de Harrys em tecido cicatricial e uma menor quantidade de colágeno tipo I na região cicatricial em relação à pele adjacente e quando se compara GB7 e GA7 com GS7.



Fotomicrografias de imunohistoquímica de colágeno tipo I nos grupos com amostras coletadas no 14º dia (GS14, GB14, GA14). ). Aumento de 400 X. 1: Colágeno tipo I em região de tecido cicatricial; 2: Colágeno tipo I em região de pele adjacente. Há maior presença de infiltrado inflamatório corado pela Hematoxilina de Harrys em tecido cicatricial e uma menor quantidade de colágeno tipo I na região cicatricial em relação à pele adjacente e quando se compara GB14 e GA14 com GS14.

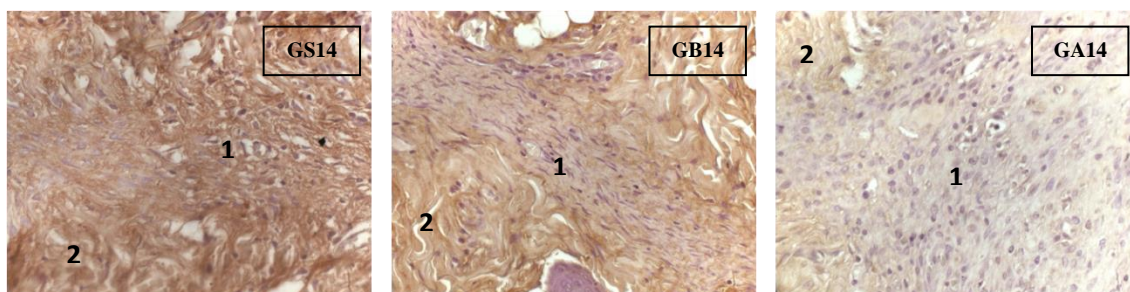


### Apêndice 13



Fotomicrografias de imunohistoquímica de colágeno tipo III nos grupos amostras coletadas no 7º dia (GS7, GB7, GA7). Aumento de 400 X.

1: Colágeno tipo III em região de tecido cicatricial. 2: Colágeno tipo III em região de pele adjacente. Há uma maior presença de infiltrado inflamatório corado pela Hematoxilina de Harrys em tecido cicatricial e uma menor quantidade de colágeno tipo III na região cicatricial em relação à pele adjacente.

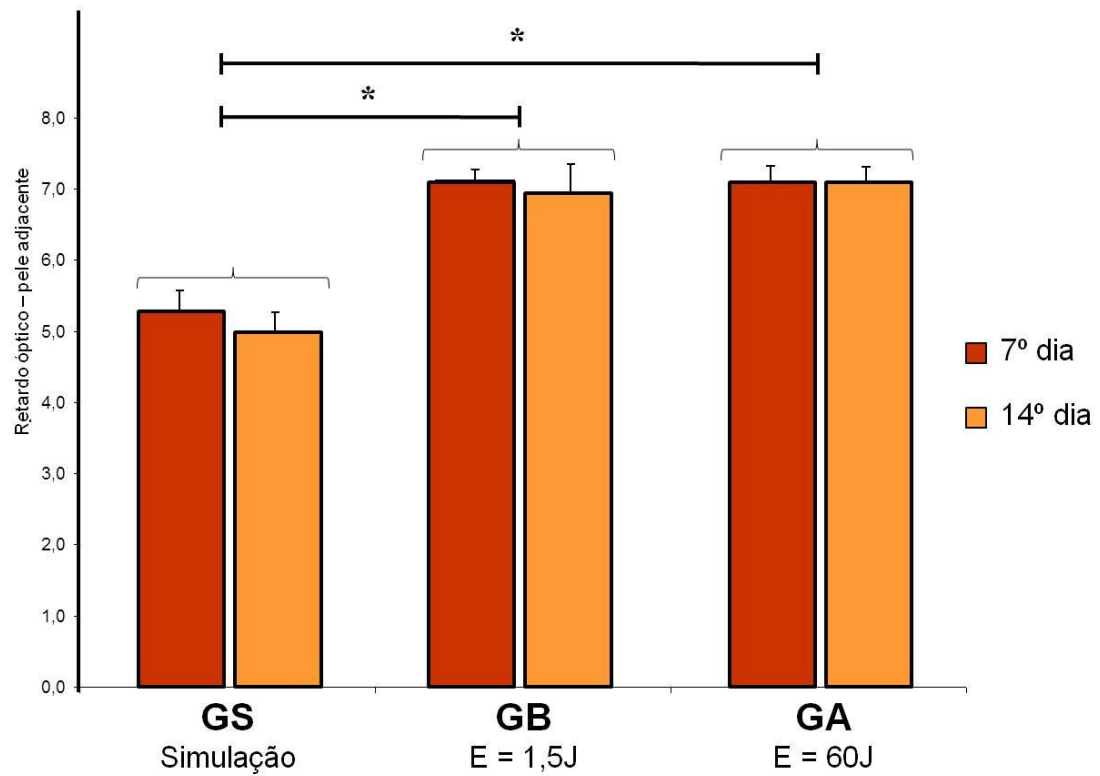


Fotomicrografias de imunohistoquímica de colágeno tipo III nos grupos com amostras coletadas no 14º dia (GS14, GB14, GA14). Aumento de 400 X.

1: Colágeno tipo III em região de tecido cicatricial; 2: Colágeno tipo III em região de pele adjacente. Há uma maior presença de infiltrado inflamatório corado pela Hematoxilina de Harrys em tecido cicatricial e uma menor quantidade de colágeno tipo III na região cicatricial em relação à pele adjacente.

## Apêndice 14

Gráfico para representação das médias de RO (em nm) na pele adjacente segundo grupos e dias de coleta.

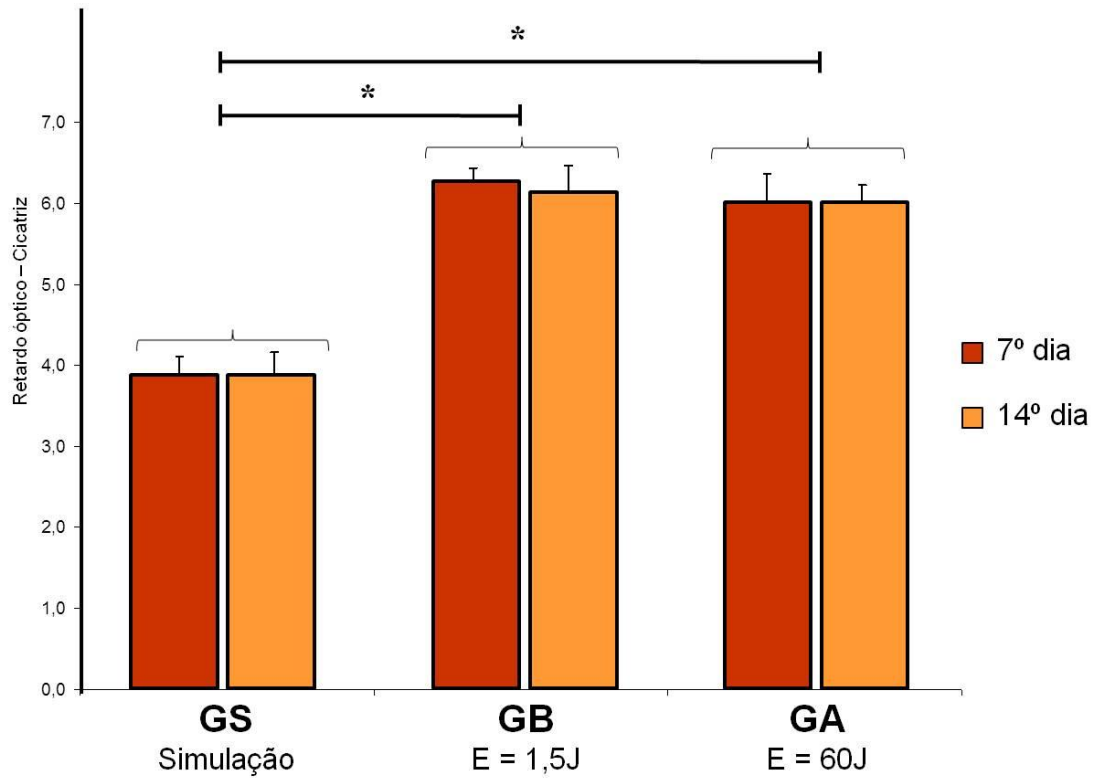


\*  $p < 0,05$

Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

### Apêndice 15

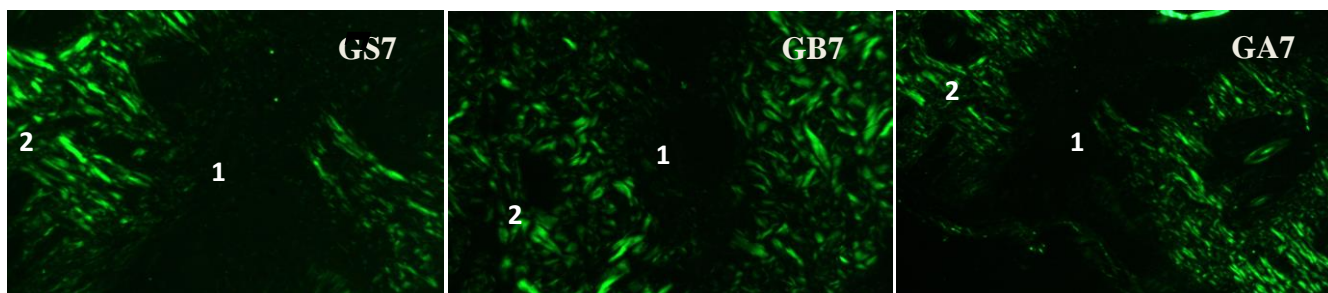
Gráfico para representação das médias de RO (em nm) na cicatriz segundo grupos e dias de coleta.



\*  $p < 0,05$

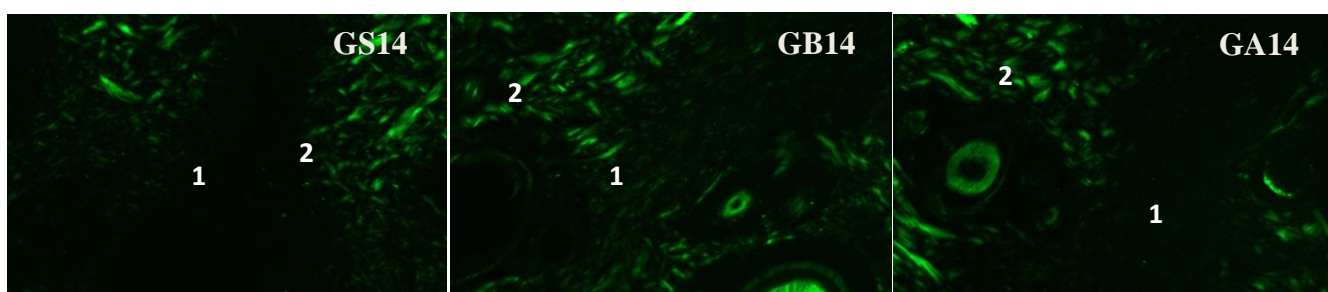
Teste: Comparações múltiplas de Bonferroni

## Apêndice 16



Fotomicrografias birrefringência de fibras colágenas nos grupos com amostras coletadas no 7º dia (GS7, GB7, GA7). Aumento de 200 X. 1: Tecido cicatricial; 2: Pele adjacente.

Observa-se que a pele adjacente apresenta maior brilho que o tecido cicatricial. É possível verificar maior brilho na região de tecido cicatricial de GB7 e GA7 em relação



Fotomicrografias de birrefringência de fibras colágenas nos grupos com amostras coletadas no 7º dia (GS14, GB14, GA14). Aumento de 200 X. 1: Tecido cicatricial; 2: Pele adjacente.

Observa-se que a pele adjacente apresenta maior brilho que o tecido cicatricial. É possível verificar maior brilho na região de tecido cicatricial de GB14 e GA14 em

## Apêndice 17

### Estudo Piloto

Foi realizado um estudo piloto com delineamento semelhante ao presente trabalho, com amostra de 27 animais distribuídos em 3 grupos em função da energia (GS: simulação; GB: 1,5 J; GA: 60 J) e 3 subgrupos em função do dia de coleta de tecido: 7, 14 e 21 dias ( $n = 3$ ). Foram realizadas análises de hematoxilina-eosina (HE) e *Picro sirius red*.

Em função da amostra estar distribuída em 9 grupos e o  $n$  ser baixo, somado ao fato de que houve perda de 3 animais e muitas lâminas de HE não permitirem avaliação precisa dos parâmetros, não foi possível estabelecer conclusões.

Nos Apêndices 17 e 18 estão relacionadas as tabelas e figuras das imagens obtidas de colágeno por microscopia de polarização.

## Apêndice 18

**Tabela 1 – Descrição dos parâmetros de hematoxilina-eosina em cada grupo segundo dias de coleta no estudo piloto.**

Variável	Grupo	7° dia				14° dia				21° dia			
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n
Fibroblastos	GS	Não avaliável			3	1	0	1	2	0,66	0,57	1	3
	GB	1	1,41	1	2	1	0	1	3	0,66	0,57	1	3
	GA	1	0	1	1	Não avaliável			1	1	0	1	3
Infiltrado	GS	Não avaliável			3	0	0	0	2	0	0	0	3
	GB	0,5	0,7	0,5	2	0,33	0,57	0	3	0,66	0,57	1	3
	GA	0	0	0	1	Não avaliável			1	0	0	0	3
Vasos	GS	Não avaliável			3	1	0	1	2	0	0	0	3
	GB	0,5	0,7	0,5	2	0,66	0,57	1	3	0,66	0,57	1	3
	GA	0	0	0	1	Não avaliável			1	1	0	1	3
Tecido de granulação	GS	Não avaliável			3	0,5	0,7	0,5	2	0	0	0	3
	GB	0,5	0,7	0,5	2	0,33	0,57	0	3	0,33	0,57	0	3
	GA	0	0	0	1	Não avaliável			1	0	0	0	3

GS: Grupo Simulado; GB: Grupo Baixa Dose; GA: Grupo Alta Dose.  
DP: desvio padrão

## Apêndice 19

**Tabela 2 – Descrição das áreas percentuais de colágeno tipo I e tipo III no estudo piloto**

Variável	Grupo	7° dia			14° dia				21° dia				
		Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n	Média	DP	Mediana	n
Colágeno Tipo I	GS	51,86	9,47	47,95	3	29,08	20,4	30,23	3	42,19	18,12	48,9	3
	GB	65,87	10,98	65,87	2	28,94	16,4	29,42	3	38,48	1,9	38,48	2
	GA	13,77	2,87	13,77	2	61,56	7,62	65,06	3	24,39	19,64	13,71	3
Colágeno Tipo III	GS	21,1	15,31	13,2	3	10,5	4,28	11,01	3	19,35	5,95	20,83	3
	GB	9,92	2,53	9,92	2	7,59	4,65	5,13	3	16,46	11,2	16,46	2
	GA	31,31	0,41	31,31	2	20,37	4,18	19,11	3	13,52	2,26	14,83	3

GS: Grupo Simulado; GB: Grupo Baixa Dose; GA: Grupo Alta Dose.  
DP: desvio padrão

## Anexo 1

São Carlos, 12 de Junho de 2012

### *Laudo Técnico*

Modelo do Equipamento: ~~Photex Laser III~~

Número de série: 7254

Os testes mencionados neste laudo possuem a finalidade de atender aos rigorosos padrões de qualidade exigidos pela empresa D.M.C. Equipamentos.

#### **Aferição de Potência:**

Estabelece o comparativo entre as Potências determinadas e as Potências medidas.

Temperatura Ambiente: 24,6° C

Medidor Laser utilizado: ~~Cobertex~~ LM 10-HTD

#### **Lasertéria:**

Tipo de Laser	$\lambda$ (nm)	Melo Ativo	Potência Referia	Potência Medida
Vermelho	660	IN Ga AL P	100 mW	102 mW
Infravermelho	808	As Ga Al	100 mW	103 mW
Tipo de Condutor Óptico	Abertura Numérica	Comprimento	Seção Transversal	
Fibra Óptica de <del>Silica</del>	0,48	8 cm	1 mm	

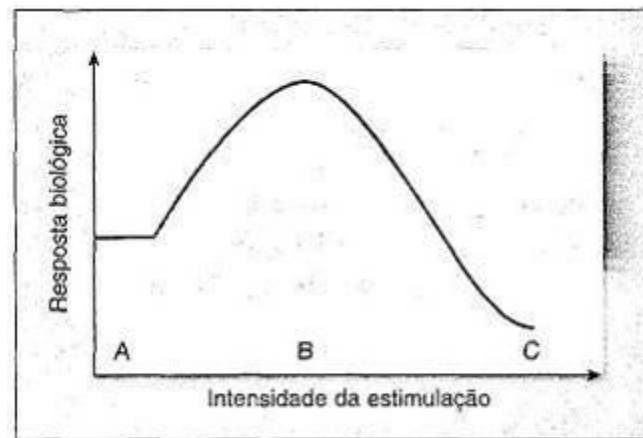
#### **Avaliação Técnica:**

A calibração atende a todos os requisitos do Controle de Qualidade da empresa.

**Abelardo Oppermann**  
Técnico responsável pela calibração



## Anexo 2



**Figura 12.3** A lei de Arndt-Schultz. A: Pré-limiar: sem ativação biológica (repouso). B: Bioestimulação: ativação dos processos biológicos. C: Bioinibição: inibição de processos biológicos.

Retirado de KITCHEN (2003)

**FONTES CONSULTADAS**

Ferreira ABH. Miniaurélio século XXI escolar. 4a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20 (Suppl. 2):02-9.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.

Kitchen S. Eletroterapia baseada em evidências 11a ed. São Paulo: Manole; 2003.

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5a. ed. São Paulo: Global 2009. 976p. Disponível no endereço eletrônico:

<http://www.academia.org.br/abl/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=23>