



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KELLY CRISTINA BORGES TACON SANTOS

Atividade Cicatrizante do Laser AlGaInP em Feridas Cutâneas
Induzidas em Ratos Wistar

Goiânia
2011

KELLY CRISTINA BORGES TACON SANTOS

**Atividade Cicatrizante do Laser AlGaInP em Feridas Cutâneas
Induzidas em Ratos Wistar**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Luiz Carlos da Cunha

Co-orientador: Leila Maria Leal Parente

Goiânia

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

T119a Tacon, Kelly Cristina Borges.
Atividade cicatrizante do laser AlGaInP em feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar [manuscrito] / Kelly Cristina Borges Tacon. - 2011.
64 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices.

1. Feridas Cutâneas. 2. Terapia a Laser de Baixa Intensidade.
3. Ratos. I. Título.

CDU: 616-001.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“ATIVIDADE CICATRIZANTE EM FERIDAS CUTÂNEAS
INDUZIDA EM RATOS WISTAR”

KELLY CRISTINA BORGES TACON SANTOS

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha - Presidente

Profa. Dra. Leila Maria Leal Parente – Membro

Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa – Membro

Profa. Dra. Rejane F. Ribeiro-Rotta – Suplente

Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara – Suplente

Goiânia, 14 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Claudiomar Tacon e Estela Marcia Borges Tacon e ao meu irmão Edmo Tacon, pelas orações, pelo amor que sempre me envolveu me fazendo seguir em frente e alcançar os meus sonhos.

Ao meu esposo Hugo Campos Oliveira Santos, que me ajudou disposição, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelo imenso amor e pela paz colocada em meu coração nos momentos de aflição.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, pela amizade, por me orientar sempre com tanta disposição e pelos seus ensinamentos.

À minha Co-orientadora, Prof^a. Dra. Leila Maria Leal Parente, que sempre me recebeu com amor e dedicação, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ruy Lino de Souza Junior, pelas inúmeras horas de dedicação em seu laboratório, contribuindo para meu crescimento profissional.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas (NEPET) Hugo Bazílio, Nádylla Zanon e Fernanda Bellato (Secretária do programa de Pós – graduação em Ciências Farmacêuticas - UFG).

À Valdecina, Secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - UFG, pelo incentivo.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, que colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Sala de Experimentação Animal do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas (NEPET), da Faculdade de Farmácia e da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás - UFG.

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Ao Departamento de Anatomohistopatologia do Hospital Geral de Goiânia (HGG), que contribuiu para a confecção do material histológico.

Ao Departamento de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) que contribuiu para a análise do material histológico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior CAPES – pela bolsa.

Aos colegas da Pós-graduação pelo apoio, troca de experiências e amizade.

À todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para que esta pesquisa fosse realizada.

“Ninguém é tão grande que não possa
aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”

Esopo, Fabulista Grego

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Etapas no Processo de Cicatrização	20
2.2 <i>Laser</i> – aspecto histórico	21
2.3 Efeito terapêutico dos <i>lasers</i>	22
2.4 Princípios da laserterapia.....	23
2.5 Contra – indicações dos <i>lasers</i>	25
2.6 Classificação quanto a sua periculosidade.....	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E METODO (S)	28
3.1 Animais experimentais.....	28
3.2 Modelo de feridas cutâneas em ratos	29
3.3 Procedimento cirúrgico	29
3.4 Irradiação do <i>laser</i>	30
3.5 Avaliação Macroscópica	32
3.6 Avaliação Histológica e Morfométrica	34
3.7 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Avaliação Macroscópica	36
4.2 Avaliação Histológica e Morfométrica.....	39
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	59
APÊNDICES	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Contra – Indicações dos <i>lasers</i>	25
Quadro 2	Classificação dos <i>lasers</i> Quanto a Periculosidade.....	26
Quadro 3	Planilha de Avaliação Diária dos Animais	33

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1	Média e desvio padrão dos pesos dos animais dos grupos 5, 10 e 15º dias nos dias da lesão e eutanásia.....	36
Tabela 2	Valores Médios e Desvio Padrão da contração das feridas cutâneas em ratos (%) dos grupos Controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) aos 5º, 10º e 15º dias da lesão.....	38
Tabela 3	Medianas dos processos patológicos avaliadas ao 5º dia da lesão nos grupos Controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²)	39
Tabela 4	Medianas da quantificação de vasos avaliada por morfometria no 5º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²)	39
Tabela 5	Medianas dos processos patológicos ao 10º dia da lesão nos grupos Controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²)	41
Tabela 6	Medianas do colágeno avaliado por morfometria (picrossírius) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²)	44
Tabela 7	Medianas dos processos patológicos ao 15º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²)	45
Tabela 8	Medianas do colágeno avaliado por morfometria (Picrossírius) no 15º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²).....	45
Figura 1	Acondicionamento dos animais em gaiolas de polietileno com divisória para dois animais.....	28
Figura 2	Divisão dos grupos e subgrupos experimentais.....	29
Figura 3	Procedimento Cirúrgico A – anestesia, B – tricotomia em região dorsocervical, C - marcação e corte no local da ferida com instrumento cirúrgico (<i>punch</i>), D - remoção do fragmento da ferida.....	30
Figura 4	Material utilizado para o tratamento dos animais (grupos L3 e L60, <i>laser</i> AlGaInP, 660nm, óculos de proteção, luvas e solução fisiológica (0,9%).....	31
Figura 5	Dias de tratamento realizados nos 3 grupos experimentais GC – Controle; grupos tratados L3 – <i>laser</i> L3 (3J/cm ²) e L6 – <i>laser</i> (6J/cm ²) no 5, 10 e 15º dia da lesão.....	32
Figura 6	Tratamento utilizando laser AlGaInP 660nm, modo pontual com 1cm	

	de distância nas bordas da ferida (4 pontos demarcados) e modo varredura no leito da ferida	32
Figura 7	Câmera digital fotográfica acoplada a um tripé a 15cm de distância do animal, com iluminação adequada para obtenção das imagens.....	34
Figura 8	Média e desvio padrão dos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) na contração das feridas cutâneas em ratos (%) no 10º dia (ANOVA, pós-testeTukey, p<0,05*).....	37
Figura 9	Médias e desvio padrão dos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) da contração das feridas cutâneas em ratos (%) no 10º dia (ANOVA, pós-testeTukey, p<0,05*).....	38
Figura 10	Mediana da quantificação de vasos sanguíneos de feridas cutâneas em ratos dos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) no 5º dia da lesão (Teste Kruskal-Wallis, p<0,05*).....	40
Figura 11	Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos 5º dia da lesão evidenciando aumento de vasos (setas). Grupos controle (A1), L3 (B1) e L6 (C1) respectivamente. Hematoxilina–eosina 20µm.40x.....	40
Figura 12	Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 10º dia da lesão, evidenciando hemorragia. Grupos controle (A1) e L3 (B1), respectivamente. Hematoxilina–eosina. 20µm.40x.....	42
Figura 13	Medianas de células polimorfonucleares avaliadas no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) (Teste Kruskal- Wallis, p<0,05*).....	43
Figura 14	Medianas do colágeno avaliado histologicamente (Hematoxilina-eosina) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) (Teste Kruskal- Wallis, p<0,05*)	43
Figura 15	Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 10 (A1, B1e C1) e 15 B2 e C2) dias da lesão, evidenciando colágeno. Grupos controle (A), L3(B) e L6 (C) respectivamente. 50x	43
Figura 16	Medianas do colágeno avaliado por morfometria (picrossírius) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6 (<i>laser</i> 6J/cm ²) (Teste Kruskal-Wallis, p<0,05*).....	44
Figura 17	Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 10 (A1, B1e C1) e 15 (A2, B2 e C2) dias da lesão, evidenciando colágeno. Grupos controle.	

	(A), L3(B) e L6(C) respectivamente. Picrossírius. 200x.....	46
Figura 18	Medianas do colágeno avaliado por morfometria (picrossírius) no 15º dia da lesão nos grupos controle, L3 (<i>laser</i> 3J/cm ²) e L6(<i>laser</i> 6J/cm ²) (Teste Kruskal- Wallis, p<0,05*).....	47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AsGa	Arseneto de Gálio
AsGaAl	Arseneto de Gálio Alumínio
AlGaInP	Alumínio – Gálio – Índio – Fósforo
ATP	Adenosina Trifosfato
CO₂	Dióxido de Carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação em Animais
Cm	Centímetro
Er: YAG	Érbio: Ítrio-Alumínio-Granada
GC	Grupo Controle
Ho:YAG	Ítrio-Alumínio-Granada
He	Hematoxilina – eosina
J/cm²	Joule por Centímetro quadrado
L3	Grupo tratado com densidade de energia de 3J/cm ²
L6	Grupo tratado com densidade de energia de 6J/cm ²
LBI	<i>Laser</i> de Baixa Intensidade
mW	Miliwatts
Nd:YAG	Ítrio-Alumínio-Granada
PO	Pós-operatório

RESUMO

Objetivo: Analisar a atividade cicatrizante do laser AlGaInP em feridas cutâneas induzidas em ratos wistar. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo experimental, pré-clínico, realizado na sala de experimentação do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas. Foram utilizados para o experimento 54 ratos fêmeas linhagem *Wistar* distribuídos em 3 grupos de 18 animais e subdivididos em 3 grupos de 6 animais. Os animais foram pesados, tricotomizados, anestesiados e posteriormente submetidos a uma incisão cirúrgica em região dorso-cervical de todos os animais utilizando um punch de 1cm (diâmetro). Após 24 horas da cirurgia utilizou-se o laser diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo - AlGaInP (IBRAMED – Laserpulse) com uma potência contínua de 30 mW e comprimento de onda (λ) de 660 nm para o tratamento dos grupos L3 e L6 (3 e 6J/cm² + solução fisiológica (0,9%) respectivamente e para o grupo controle (GC) utilizou-se apenas solução fisiológica (0,9%). Os animais (n=6) de cada grupo foram eutanasiados no 5, 10 e 15º dias após a lesão. As amostras obtidas foram emblocadas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina e picrossírius. Foi observado diariamente o aspecto da ferida durante o processo de cicatrização e anotado em planilha individual, sempre pelo mesmo examinador. Os dados da avaliação histológica obtidos foram transformados em variáveis quantitativas, pela atribuição de escore: ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e acentuado (acima de 50%). Para análise morfométrica, utilizou-se o programa Image J. A contagem do número de vasos sanguíneos utilizou-se a planimetria por contagem de pontos. Para análise do colágeno utilizou-se coloração picrossírius e luz polarizada para digitalizar as imagens. Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para as variáveis não – paramétricas utilizou-se o teste Kruskal – Wallis. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. **Resultados:** Observou-se uma diferença estatística significativa na contração da borda da ferida no grupo L3 em relação aos grupos GC e L6 no 10º dia da lesão, indicando que o Laser na densidade de energia 3J/cm² atuou de forma positiva no processo de cicatrização. Durante a avaliação histológica, observou-se diminuição da hemorragia ($p=0,007$) do grupo L3 em relação ao controle e também no número de polimorfonucleares ($p=0,045$) dos grupos tratados L3 e L6 em relação ao controle. Ainda no 10º dia observou-se também um aumento no conteúdo de colágeno ($p=0,003$) nos grupos L3 e L6 em relação ao controle. No 15º dia foi observado um aumento significativo no conteúdo de colágeno ($p=0,034$) do grupo L6 em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A atividade cicatrizante do laser AlGaInP foi evidenciada pelo aumento da angiogênese, diminuição da inflamação e estímulo da fibroplasia. Dessa forma admite-se que o laser utilizado no estudo contribuiu de forma positiva em ambas as fases testadas (inflamatória e proliferativa) para acelerar o processo de cicatrização e também que as densidades de energia propostas 3 e 6 J/cm² responderam ao tipo de tratamento proposto neste estudo.

Descritores: Cicatrização de Feridas. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Ratos.

ABSTRACT

Objective: To analyze the healing activity AlGaInP laser in induced skin wounds in rats wistar. **Materials and Methods:** This is an experimental study, pre-clinical trial conducted in the room at the Center for Research and Toxic-pharmacological approaches. Were used for the experiment 54 Wistar rats divided into 3 groups of 18 animals and divided into 3 groups of 6 animals. The animals were weighed, tricotomizados anesthetized and then subjected to a surgical incision in the dorsal-neck of all animals using a punch of 1 cm (diameter). After 24 hours of surgery, we used the laser diode Aluminum Indium Gallium Phosphorus - AlGaInP (IBRAMED - Laserpulse) with a continuous power of 30 mW and wavelength (λ) of 660 nm for the treatment groups L3 and L6 (3 and 6J/cm² + saline (0.9%) respectively and for the control group (CG) received only saline (0.9%). The animals (n = 6) for each group were euthanized at 5, 10 and 15th days after injury. The samples were embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin and picrossírius. We observed the daily appearance of the wound during the healing process and noted in individual spreadsheet, by the same examiner. Data from histological evaluation were converted in quantitative variables by assigning scores: absent (0), mild (1-25%), moderate (25-50%) and severe (above 50%). For morphometric analysis, we used the program Image J. The count of the number of blood vessels was used for point counting planimetry. For analysis of collagen was used picrossírius staining and polarized light to scan images. The data were treated statistically by analysis of variance (ANOVA) and post-Tukey test. For the non - parametric variables we used the Kruskal - Wallis test. The significance level was set at (p<0.05). **Results:** There was a statistically significant difference in the contraction of the wound edge in L3 group compared to GC and L6 on the 10th day of the injury, indicating that the laser energy density 3J/cm² acted positively in the healing process. During the histological assessment, we observed reduction of bleeding (p=0.007) L3 group compared to control and to the number of polymorphonuclear (p=0.045) treated groups L3 and L6 compared to control. Also on the 10th day there was also an increase in collagen content (p=0.003) L3 and L6 in the groups compared to control. On the 15th day was observed a significant increase in collagen content (p=0.034) of the L6 in the control group. **Conclusion:** The wound healing activity AlGaInP laser was evidenced by increased angiogenesis, decreasing inflammation and stimulation of fibroplasia. Thus it is assumed that the laser used in the study contributed positively tested in both phases (inflammatory and proliferative) to accelerate the healing process and also that the energy densities of three proposals 6J/cm² and responded to the type of treatment proposed in this study.

Keywords: Wound healing. Laser Therapy, Low Intensity. Rats.

1 INTRODUÇÃO

As lesões cutâneas podem representar uma variedade de injúrias traumáticas, isquêmicas, cirúrgicas ou pressóricas (úlceras de pressão), caracterizadas por uma agressão nas estruturas histológicas do tecido tegumentar (TAYAR; PETERLINI, PEDREIRA, 2007).

As cicatrizes são resultado inevitável da lesão, intencional ou acidental, da pele (GUIRRO; GUIRRO, 2004). O processo de cicatrização dérmica inicia-se logo após a lesão, com formação do coágulo sanguíneo que atua como tampão hemostático e substrato para a organização da ferida (MIDWOOD; WILLIAMS, SCHWARZBAUER, 2004; BALBINO; PEREIRA, CURI, 2005; HOSGOOD, 2006).

Alguns fatores podem interferir na cicatrização da ferida como idade do paciente, estado nutricional, obesidade e tabagismo, pois, o processo cicatricial é sistêmico, dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. A cicatrização também depende de fatores locais como a localização anatômica, tipo da pele, raça e técnica cirúrgica utilizada. No Brasil as feridas representam um sério problema de saúde pública acometendo a população geral, independente de sexo, idade ou etnia (CANDIDO, 2001; MOURA; SILVA, GODOY, 2005).

Este processo também envolve a compreensão de várias fases complexas, interdependentes e simultânea, em plena atividade celular e quimiotática, com liberação de mediadores químicos associados a respostas vasculares. Essa sequência de eventos culmina no total fechamento da derme lesionada, sendo o reparo constituído pelas fases de inflamação, reepitelização, contração e remodelamento da matriz (SAY, 2003; KITCHEN, 2003; CARVALHO et al., 2003).

O reconhecimento dos estágios da cicatrização da ferida baseado em características macroscópicas, permite fazer uma associação entre eventos microscópicos e bioquímicos. O conhecimento desses eventos direciona o tratamento adequado da ferida (HOSGOOD, 2006).

Manuscritos egípcios que datam de 3000-2500 a.C mencionam curativos à base de mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos, que faziam parte dos princípios da farmacopéia egípcia (ZIMMERMAN; VEITH, 1961).

Hipócrates lançou as bases da medicina científica e criou os conceitos de cicatrização por primeira ou segunda intenção. Recomendava que as feridas fossem mantidas limpas e secas, e preconizava sua limpeza com água morna, vinho e vinagre (DEALEY, 2001).

Ao final da Segunda Guerra Mundial, o foco para o tratamento de feridas e cicatrização foi à utilização de anti-sépticos e agentes tópicos com ação antimicrobiana e a proteção com coberturas secas (SINCLAIR; RYAN, 2003).

O impacto social e econômico da cronificação de feridas e suas consequências, devido à infecção local ou sistêmica, tem sido alvo de grande preocupação por parte dos profissionais, fazendo com que, na década de 1990 a utilização de anti-sépticos e dos mais variados tipos de agentes antimicrobianos se tornasse uma panacéia com repercussões extremamente danosas (RIBEIRO, 2001).

Neste contexto, várias modalidades terapêuticas têm sido estudadas no sentido de se buscar métodos mais adequados para melhorar e acelerar o processo cicatricial. Nos últimos anos a fototerapia por meio de luzes coerentes tem sido muito estudada e caracterizada (SMITH, 2005).

Muitas medidas têm sido propostas para acelerar o processo de cicatrização, dentre os recursos fisioterapêuticos utilizados, o laser de baixa intensidade (LBI) vem se destacando, quando comparado a outros recursos utilizados rotineiramente, por apresentar efeitos notáveis sobre a remodelação de tecidos cicatriciais, pela redução do edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose e da síntese de colágeno e reepitelização (CARVALHO *et al.*, 2003).

Com a tecnologia a favor da ciência, formas de *lasers* foram desenvolvidas nas últimas décadas, sendo LBI largamente empregado em técnicas terapêuticas, com o propósito de diminuir o quadro algico e promover aceleração no processo de cicatrização, tanto no homem como nos animais, desde a década de 60 (RAMEY; BASFORD, 2000).

Os primeiros tratamentos de úlceras com *laser* de baixa intensidade (LBI) foram realizados durante a década de 60, utilizando-se *laser* HeNe com doses de até 4J/cm², onde pode-se observar uma aceleração no processo de cicatrização. Nas ultimas décadas, os efeitos da Laserterapia foram avaliados no tratamento de vários tipos de feridas e lesões ulceradas, com resultados positivos, principalmente nos casos mais crônicos e de difícil resolução (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Alterações na cicatrização de feridas podem vir a apresentar um alto custo para a sociedade e também diminuir a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo todo (KRISHNAN, 2006).

Estudos realizados com o *laser* Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP) comprovam que o tempo de cicatrização dos animais irradiados é menor dos que os não radiados, provocando redução do processo inflamatório e infeccioso, independente da dose empregada (MARCON; SANFELICE, 2005).

Apesar do laser AlGaInP ser muito utilizado para o tratamento de feridas pelos profissionais da saúde, poucas pesquisas foram realizadas utilizando esse tipo de laser. Pelo fato de ser um laser moderno e altamente tecnológico, admite-se falta de padronização nos poucos estudos relacionados a esse tipo de laser e consequentemente informações pouco conclusivas ao seu respeito. Até o momento o que se sabe é que sua potência de 30mW permite utilizar densidades de energia menores e também um menor tempo de exposição do tecido, consequentemente um menor tempo de terapia. Porém os mecanismos com que se obtêm efeitos terapêuticos obtidos quando esse comprimento de onda de 660nm enquadra na faixa terapêutica e penetra o tecido, bem como a melhor densidade de energia e a fase de melhor atuação desse tipo de laser no processo de cicatrização precisam de melhor entendimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etapas no Processo de Cicatrização

Alguns autores consideram três estágios no processo de cicatrização em fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Porém, outros autores classificam essas fases de uma forma mais detalhada e completa em cinco fases: coagulação, inflamatória, proliferativa, contração da ferida e remodelação (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000), abaixo descritas:

A) Coagulação – Ocorre uma complexa liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. Esta fase é importante para coaptar as bordas das feridas, e também ocorre o cruzamento da fibronectina, formando uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos adentram a ferida (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000).

B) Inflamação – Esta fase está intimamente ligada à etapa de coagulação. A inflamação depende de inúmeros mediadores químicos e células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), que estão presentes de 3º a 5º dia após a lesão responsáveis pela fagocitose das bactérias, já os macrófagos estão presente de 3º ao 10º dia após a lesão, e são responsáveis por fagocitar as bactérias, desbridar corpos estranhos e direcionar o desenvolvimento de tecido de granulação. A fibronectina forma a base para matriz extracelular e tem propriedades quimiotáticas, promove a psonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias. Como consequência, do ponto de vista fisiopatológico, no local da ferida forma-se um exsudato, com sinais característicos inflamatórios: tumor, rubor, calor, hiperemia e dor (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000; GUIRRO; GUIRRO, 2004).

C) Proliferação – esta fase é responsável pelo "fechamento" da lesão propriamente dita. Durante a formação do novo tecido, ocorre proliferação de células endoteliais e formação de novos vasos sanguíneos (GUIRRO; GUIRRO, 2004).Essa fase pode ser subdividida em:

Reepitelização: Faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens nas de espessura total sendo que, fatores de crescimento são

os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio. Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000).

Fibroplasia: A principal característica dessa fase é a atividade dos fibroblastos na produção de colágeno (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000).

Angiogênese: Crescimento de novos vasos a partir dos já existentes. Essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000).

Contração da Ferida - É uma fase dinâmica, que objetiva a redução das bordas da ferida (espessura total), produzindo um movimento centrípeto das contribuindo para o fechamento da mesma (FAZIO; ZITELLI, GOSLEN, 2000).

Remodelação – Representa a última fase do processo de cicatrização. Ocorre no colágeno e na matriz; tem a duração de meses, e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

A neovasculatura diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. A ferida madura tem uma superfície epitelial íntegra que inicialmente apresenta uma coloração rosa “luminosa” devido à vascularização do tecido de granulação subjacente, a superfície epitelial começa a se tornar pálida, devido à redução nessa vasculatura com o avanço no processo de cicatrização (HOSGOOD, 2006).

2.2 Laser – aspecto histórico

Em 1916, Albert Einstein, descreveu pela primeira vez o fenômeno físico da emissão estimulada de radiação. A palavra *laser*, um acrônimo (LOW; REED, 2001), é a abreviatura de “*Ligh Amplification By Stimulated Emission Of Radiation*”, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. É uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, sendo que o resultado dependerá do tecido irradiado e do tipo de *laser* utilizado (DAMANTE, 2003).

Os primeiros *lasers* médicos desenvolvidos na década de 60 e 70 eram usados para destruição tecidual e coagulação, esse período ficou conhecido na medicina como “Síndrome da Luz Vermelha”, principalmente utilizada por Finsen, considerada o pai da fototerapia contemporânea. Durante experimentos realizados por Finsen, percebeu-se que nos locais onde havia aplicado o LBI, houve um efeito benéfico na cicatrização de feridas e também baseado nesse protótipo, surgiram vários tipos de *lasers* (ORTIZ et al., 2001b; ALBERTINI et al., 2002).

Foi desenvolvido, em 1961, o LBI Hélio-Neônio (HeNe), emitindo a radiação visível vermelha, com 632,8nm de comprimento de onda, tornando-se o *laser* mais empregado para a realização de aplicações atérmicas. Em 1965, foi criado por Sinclair e Knoll um aparelho de *laser*, com efeito, de bioestimulação dos tecidos, o chamado *laser* terapêutico (MESTER; MESTER, MESTER, 1985; BAXTER, 1997).

Os tratamentos experimentais em pacientes iniciaram-se na década de 70 após relatos de resultados positivos da irradiação com a terapia a LBI em culturas de células e em experimentos animais. No final da década 70, os *lasers* Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), faixa infravermelha, fora do alcance da emissão visível, foram produzidos variando de 660 a 904nm (TUNÉR; HODE, 1999).

2.3 Efeito Terapêutico dos Lasers

Estudos têm utilizado feridas superficiais para avaliar os efeitos da laserterapia no processo de cicatrização. Alguns usam úlceras de vários tamanhos e profundidades e outros têm desenvolvido modelos de feridas limpas e superficiais em animais (JASZSAGI-NAG, 1973; ALLENDORF et al., 1997; MESTER; TY HOPKINS et al., 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que a regeneração tissular torna-se mais eficaz quando tratadas com LBI. Estes estudos em sua maioria *in vivo*, atribuíram à ação do LBI na cicatrização aos efeitos sobre a síntese e remodelação de colágeno, número de fibroblastos, diâmetro e força de tração das feridas tratadas, viabilidade dos enxertos, vascularização, vasodilatação, sistema linfático, efeito antibacteriano e imunológico (CARVALHO et al., 2003).

Outros trabalhos realizados, relatam que com a aplicação do LBI houve um aumento na microcirculação local (RIBEIRO et al., 2004), efeitos analgésicos

(CHOR et al., 2004), proliferação de células epiteliais e fibroblastos (KREISLER et al., 2003) assim como aumento na síntese de colágeno (PUGLIESE et al., 2003). Estudos *in vivo* mostram que a regeneração de tecido torna-se mais eficaz quando da utilização do LBI, atua sobre a síntese de colágeno atuando em sua remodelação e no aumento do número de fibroblastos atuantes na região lesada (DAMANTE, 2003).

Os LBI são utilizados como agentes terapêuticos e podem propiciar um pós-operatório (PO) mais confortável ao paciente, possibilitando a redução do uso contínuo de medicamentos analgésicos (DAMANTE, 2003). Possuem efeito analgésico, proporcionando redução da dor, efeito antiinflamatório através da síntese de prostaglandinas, efeito antiedematoso que estimula a microcirculação e efeito cicatrizante que com o estímulo à microcirculação ocorre aumento do aporte de elementos nutricionais e formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes, o que gera melhores condições para uma rápida cicatrização (HOPKINS et al., 2004).

2.4 Princípios da laserterapia

O laser é produzido a partir de elétrons ou moléculas que sofrem salto quântico quando previamente estimulados, passando de baixo para alto estado de energia. Neste processo, ocorre a emissão de ondas na mesma frequência, comprimento e direção, originando o feixe de *laser* que possui maior intensidade do que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (ASSUNÇÃO et al., 2003).

A radiação *laser* é, geralmente, aplicada na pele com uma caneta aplicadora cujo tamanho aproximado é de uma caneta esferográfica larga. O *laser* pode ser aplicado de forma pontual, varredura ou por zona. Nas lesões pequenas, a aplicação deve ser feita diretamente sobre a área lesionada. No caso de feridas extensas, com áreas largas, a lesão pode ser dividida em quadrantes de cerca de 2cm quadrados, e cada porção é irradiada separadamente (LOW; REED, 2001; KITCHEN, 2003).

O *laser* é composto por um ressonador, um meio ativo, mecanismo de bombeamento ou excitação. Baseia-se no princípio da absorção, o qual consiste em uma fonte de energia externa que excita os elétrons do meio ativo. Os mecanismos

de bombeamento podem ser descargas elétricas, o disparo de um *flash* e até uma ativação por outro *laser* (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

O tipo de *laser* é determinado pelo comprimento de onda e pelo tipo de material ou substância usada para confeccioná-lo. Essas substâncias podem estar na forma de cristais sólidos, como o Rubi sintético, Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada (Nd:YAG), Hólmio:Ítrio-Alumínio-Granada (Ho:YAG) e Érbio:Ítrio-Alumínio-Granada (Er:YAG); na forma de gases, como o Hélio-Neônio (HeNe), Argônio e o Dióxido de Carbono (CO₂); ou na forma de semicondutores diodos, como Arseneto de Gálio (GaAs) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), Alumínio-Gálio-Índio-Fosfóro (AlGaInP) ((ORTIZ et al., 2001b; AGNE, 2005).

Seus comprimentos de onda variam do espectro visível da luz ($\lambda = 400$ nm) ao infravermelho ($\lambda = 1,064$ nm) (CHOW; BARNSELEY, 2005). Em particular, as radiações a *laser* com comprimento de onda de 670.0, 830.0, 904.0 e 632.8nm apresentam a característica bioestimulatória, (GUIRRO; GUIRRO, 2004). As ondas de 660, 820 e 870nm estimulam os macrófagos a produzir fatores que levam à liberação de fibroblastos acima dos níveis de controle, enquanto a de 880nm causa inibição (CARVALHO et al., 2001). A potência de saída do LBI é baixa (2 a 30 mW), sugerindo que os efeitos biológicos ocorrem devido aos efeitos diretos da irradiação e não como resultado do aquecimento (SCHINDL et al., 2000).

Os efeitos do *laser* podem ser divididos em térmicos e não térmicos. Os *lasers* de alta intensidade ou cirúrgicos apresentam a propriedade de corte, vaporização e hemostasia dos tecidos sendo, portanto, os que apresentam efeitos térmicos. Os *lasers* de baixa intensidade, cuja terapia não se baseia em desprendimento de calor, apresentam a energia dos fótons transformada em efeitos fotoquímicos e fotobiológicos nas células e nos tecidos (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Densidade de energia é expressa em Joule por centímetro quadrado (J/cm²). Deve ser observado para cada tipo de lesão, relacionando-a com a profundidade, características teciduais, estágio da lesão e condições fisiológicas dos pacientes, como idade, raça, grau de nutrição e hidratação, assim como o estado físico e imunológico do indivíduo (PARIZOTTO, 2001).

Para evitar a acumulação de estímulos e a redução da efetividade, devem-se intercalar as aplicações do *laser* em pelo menos 24 horas. Quanto maior a potência (intensidade), menor é o tempo necessário para irradiar a área e menor

também será a densidade de energia utilizada para o tratamento (RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998).

A interação da luz com os tecidos é denominada de absorção, onde as radiações visíveis são absorvidas pela hemoglobina e melanina (cromóforos), enquanto o infravermelho é absorvido pela água. Um indivíduo negro absorverá maior quantidade de radiação do que um indivíduo branco, em função da maior quantidade de pigmentos existentes. A reflexão é o fenômeno onde para da luz é refletida e a outra parte espalha pelo tecido. E por último a transmissão, que é representada pela travessia da luz por toda a espessura do tecido (ZEZELL, 2001).

A profundidade de penetração varia de 2mm para *laser* na faixa visível de comprimento de onda a 5mm para o *laser* infravermelho (SCHINDL et al., 2000). É uma radiação obtida a partir da estimulação de um diodo semiconductor formado por cristais de (ArGa), e por isso também é chamado de *laser* semiconductor ou *laser* diódico, apresentando potencial terapêutico destacado em lesões profundas, do tipo articular e muscular (VEÇOSO, 1993).

2. 5 Contra – Indicações

A radiação através do LBI apresenta contra-indicações relativas e absolutas para seu manuseio (Quadro – 1).

Quadro 1 – Contra-Indicações dos Lasers

Relativas	Absolutas
úlceras infectadas	irradiar os olhos
região das gônadas	focos neoplásicos
epífises de crescimento	região abdominal em mulheres grávidas
	áreas hemorrágicas
	administração de drogas fotossensíveis

Fonte: DAMANTE, 2003

2.6 Classificação quanto a sua periculosidade

De acordo com Damante (2003), os lasers são classificados tendo em vista sua periculosidade. Essa classificação é baseada na potência de saída e comprimento de onda do *laser*, sendo quatro classes distintas (Quadro – 2).

Quadro 2 - Classificação dos Lasers Quanto a Periculosidade

Classe 1 – <i>lasers</i> sem perigo, cuja potência não é percebida pelos olhos (leitor de cd).
Classe 2 – perigosa, se alguém olhar diretamente para eles (leitor de código de barras).
Classe 3a – média potência e perigosos, se a luz for focalizada pelos olhos através de lentes ópticas (ponteiras <i>laser</i>).
Classe 3b – média potência - são perigosos, se forem vistos diretamente.
Classe 4 – alta potência – podem causar dano ocular não apenas por contato direto, mas também quando refletidos.

Fonte: DAMANTE, 2003

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Analisar a atividade cicatrizante do *laser* AlGaInP em feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Verificar o efeito do laser AlGaInP através da avaliação macroscópica e microscópica, por meio da indução de feridas em ratos.

✓ Identificar se existe uma fase do processo de cicatrização onde atua o laser AlGaInP.

✓ Observar se as densidades de energia propostas foram efetivas para acelerar o processo de cicatrização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

A amostra foi constituída de 54 ratos fêmeas albinos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, adultas jovens, com peso variando de 160 ± 20 gramas. Os animais, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG) Goiânia, Goiás, foram adaptados na sala de experimentação do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), na Faculdade de Farmácia - UFG, por um período de quinze dias. Foram mantidos em gaiolas de polietileno com divisórias para dois animais, forradas com maravalha, sob condições ambientais controladas (temperatura $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 50-70% e fotoperíodo claro/escuro de 12h). Água e ração foram fornecidos *ad libitum* (Figura 1)



Figura 1 – Acondicionamento dos animais em gaiolas de polietileno com divisória para dois animais.

O protocolo experimental com os animais utilizados neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o nº 030/2010.

3.2 Modelo de feridas cutâneas de ratos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de dezoito animais e posteriormente subdivididos em três grupos de seis animais cada grupo, sendo submetidos aos tratamentos: GC – grupo controle solução salina (0,9%); L3 – tratados com *laser* AlGaInP 660nm, densidade de energia 3J/cm² e solução fisiológica (0,9%); L6 - tratados com *laser* AlGaInP 660nm, densidade de energia 6J/cm² e solução fisiológica (0,9%)(Figura 2)

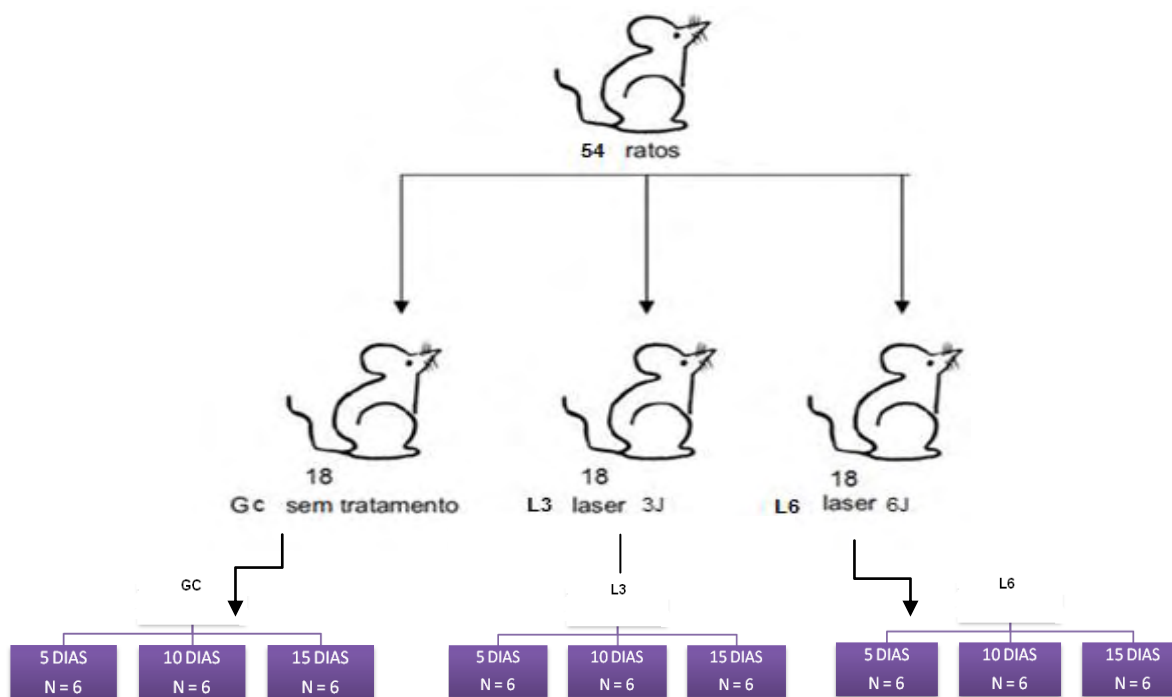


Figura 2 - Divisão dos grupos e subgrupos experimentais.

3.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram pesados e anestesiados. A anestesia consistiu da administração, por via intramuscular, da associação de cetamina e xilazina, nas

doses de 70mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, conforme modelo modificado de Parente *et al.*(2009). Posteriormente foi realizado a tricotomia em região dorso-cervical de cada animal para assepsia do local da lesão. Para a indução da ferida utilizou-se um *punch* metálico circular de 1 cm de diâmetro. (Figura 3)



Figura 3 – Procedimento Cirúrgico **A** – anestesia, **B** – tricotomia em região dorso-cervical, **C** - marcação e corte no local da ferida com instrumento cirúrgico (punch), **D** - remoção do fragmento da ferida.

Foi realizada com Cloridrato de Tramadol (dose 10mg/Kg), para alívio do quadro álgico nos animais. Por ser um opióide, não interferiu nos resultados.

3.4 Irradiação do laser

Foi utilizado para o tratamento dos grupos L3 e L6 o *laser* de diodo AlGaInP marca IBRAMED – Laserpulse, com saída contínua potência de 30 mW,

comprimento de onda (λ) de 660 nm (vermelho visível), modo contínuo, nas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $6\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 4)



Figura 4 – Material utilizado para o tratamento dos animais (grupos L3 e L6, laser AlGaInP, 660nm, óculos de proteção, luvas e solução fisiológica (0,9%).

Após 24 horas do pós-operatório (PO), em dias alternados e no mesmo horário, as feridas foram irradiadas com *laser* nas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (L3) ou $6\text{J}/\text{cm}^2$ (L6). Os animais do grupo controle, mesmo não tendo sido irradiados, ficaram contidos pelo mesmo período de tempo que os animais dos grupos L3 e L6. Após a irradiação, foram instilados 0,1mL de solução fisiológica nas feridas dos animais dos três grupos. No 5º, 10º e 15º dias do pós-operatório os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2 , para a colheita de fragmento de pele na área da ferida cirúrgica (Figuras 5 e 6). Os fragmentos foram conservados em formol tamponado a 10%.

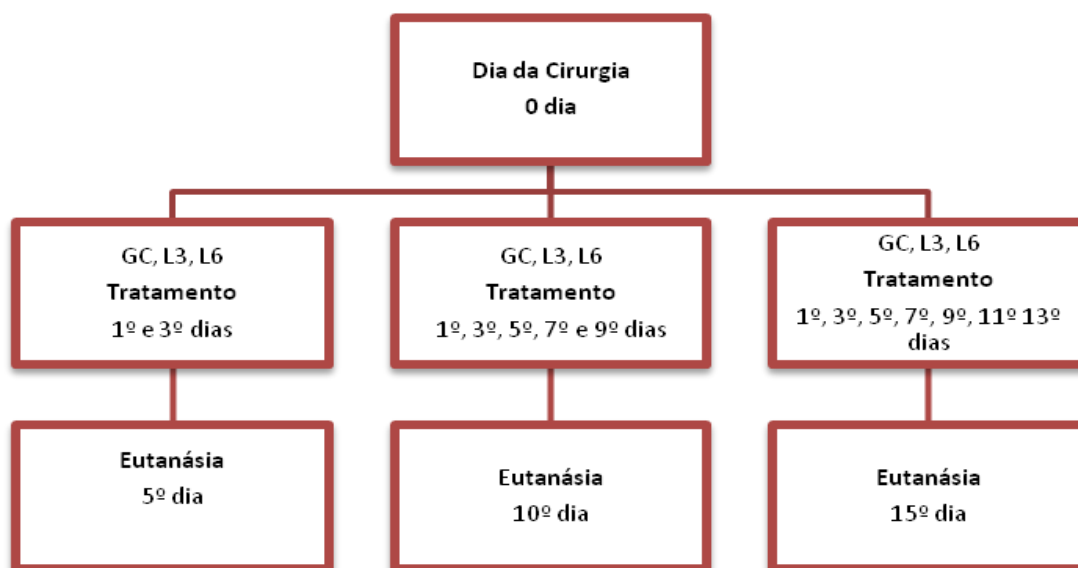


Figura 5 – Dias de tratamento realizados nos 3 grupos experimentais **GC** – Controle, grupos tratados **L3** – *laser* 3J/cm² e **L6** – *laser* 6J/cm², no 5, 10 e 15º dia após a lesão.



Figura 6 – Tratamento utilizando *laser* AlGaInP 660nm, modo pontual com 1cm de distância nas bordas da ferida (4 pontos demarcados) e modo varredura no leito da ferida.

3. 5 Avaliação macroscópica

Todos os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, ocasião em que se procedia a avaliação macroscópica da ferida, observando-

se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta, sendo os dados registrados em fichas individuais (Quadro 3)

Quadro 3 – Exemplo da planilha de avaliação diária dos animais

Animal L31 (5 Dias)	Crostas	Secreções	Hemorragia	Tamanho da ferida	Obs.
27/01	P++	A	A	N	
28/01	A	A	A	N	
29/01	A	A	A	N	
30/01	A	A	A	N	
31/01	A	A	A	N	
01/02	A	A	A	N	

Escores: A=Ausente; P= Presente; N= Normal; + Discreto; ++Moderado; +++Intenso

Para a análise morfométrica, as feridas foram fotografadas nos dias zero, 5, 10 e 15 dias da lesão, utilizando-se de uma câmera digital acoplada em tripé, mantida a uma distância constante de 15 cm da ferida, e em seguida, as imagens foram digitalizadas em microcomputador, com o auxílio do Software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). O grau de contração da área da ferida foi calculado por meio da fórmula proposta por Oliveira *et al.*(2000) (Figura 7).



Figura 7 – Câmera digital fotográfica acoplada a um tripé a 15cm de distância do animal, com iluminação adequada para obtenção das imagens.

3. 6 Avaliação histológica e morfométrica

O preparo das lâminas histológicas, as fotomicrografias, a análise morfométrica e a planimetria digital por contagem de pontos foram realizados pelo mesmo pesquisador. O número de campos fotografados de cada amostra para análise morfométrica e planimetria digital por contagem de pontos foi determinado por média acumulada.

Para a avaliação histológica, um fragmento de cada ferida foi retirado, fixado em formol tamponado a 10%, processado e corado com hematoxilina e eosina (HE). Utilizou-se também a coloração especial de picrossírius para a quantificação do colágeno, sob luz polarizada (LÓPEZ; ROJKIND, 1985) calculando-se a porcentagem de área marcada em verde ou amarelo-avermelhada por campo, por meio do software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos).

Ao exame histológico, nos dias 5, 10 e 15 da lesão, foram avaliadas as variáveis fibrina, hemorragia, hiperemia, infiltrado inflamatório, reepitelização e hiperplasia epitelial. Adotaram-se escores adaptados de Biondo-Simões et al. (2006) onde:

- Para fibrina, hemorragia, hiperemia e infiltrado inflamatório utilizaram-se os escores ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e acentuado (acima de 50%), avaliados aos 5 e 10º dias PO.
- Para a reepitelização e hiperplasia epidermal utilizaram-se os escores total ou parcial, avaliada no 15º dia PO.

A contagem do número de vasos sanguíneos do tecido cutâneo foi realizado utilizando-se a planimetria por contagem de pontos, com o auxílio do software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). Um retículo quadrangular composto por 25 pontos foi superposto à imagem histológica e apenas foram contados os vasos nas intersecções presentes no campo visual, conforme modelos propostos por (RIBATTII et al., 2000; PRADO et al., 2006).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o programa GraphPad InStat (Version 3.05 for Windows). A partir do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, as variáveis paramétricas foram avaliadas por meio de ANOVA e pós – teste de Tukey e as não-paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Macroscópica

Os animais foram pesados no dia da indução da ferida e no dia da eutanásia. Observou-se uma variação de 160 ± 20 gramas no peso. Foi descrito a Média e Desvio – padrão do peso dos animais dos grupos tratados nos 5, 10 e 15º dias da lesão (Tabela 1). Posteriormente estes valores foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de normalidade Kolmogorov e Smirnov e Teste Two – Tail. Foi observado aumento significativo de peso nos animais tratados no 15º dia da lesão ($p= 0,0044$). Não foram observados diferença estatística no peso dos animais no 5 e 10º dias da lesão.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos pesos dos animais dos grupos 5, 10 e 15º dias nos dias da lesão e eutanásia.

Grupos	5º dia	10º dia	15º dia
Dia da lesão			
Média ± DP	194,4 ± 14,56	192,2 ± 16,4	205,3 ± 22,6
Dia da eutanásia			
Média ± DP	196,3 ± 20,81	193,9 ± 19,4	186,7 ± 12,5

O procedimento operatório e o tratamento transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral, atividades física e comportamental normais para a espécie. Não foi observado exsudado purulento em nenhuma das feridas cutâneas. A área da ferida diminuiu gradativamente com a evolução do processo de cicatrização nos três grupos experimentais (Figura 8)

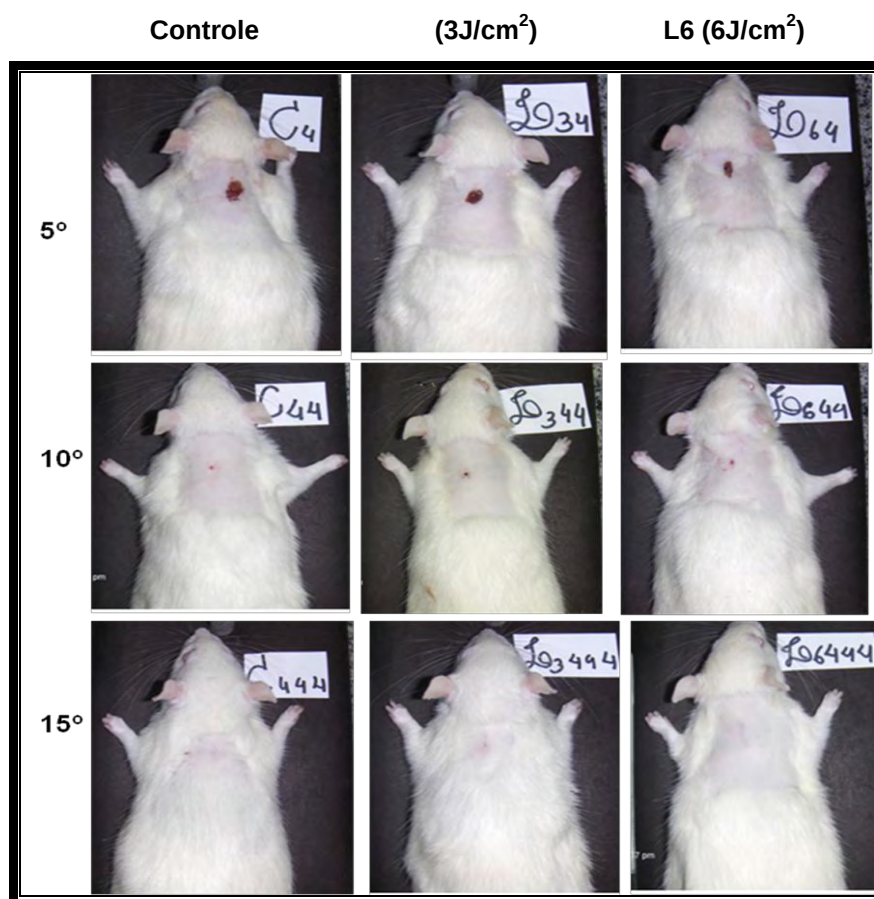


Figura 8 – Ferida cutânea em ratos no 5°, 10° e 15° dias da lesão, evidenciando a contração das bordas da ferida nos grupos tratados L3 e L6 e Controle.

As crostas começaram a se formar 2º dia após a lesão, sendo que no grupo tratado L3 e L6 apresentaram-se mais espessas e ressecadas em relação ao grupo controle, onde estavam mais umedecidas. A partir do 10º dia da lesão não foram observados a presença de crostas nos grupos tratados com laser nas densidades de energia de 3J/cm² e 6J/cm². Já no grupo controle, tratado apenas com solução fisiológica (0,9%), as feridas apresentavam-se hiperêmicas e com crostas. No 15º dia da lesão foi verificada cicatrização completa das feridas em todos os grupos experimentais.

Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo L3 no 10º dia da lesão, indicando que o laser na densidade de energia 3J/cm² atuou de forma positiva na contração das feridas cutâneas, beneficiando a contração centrípeta

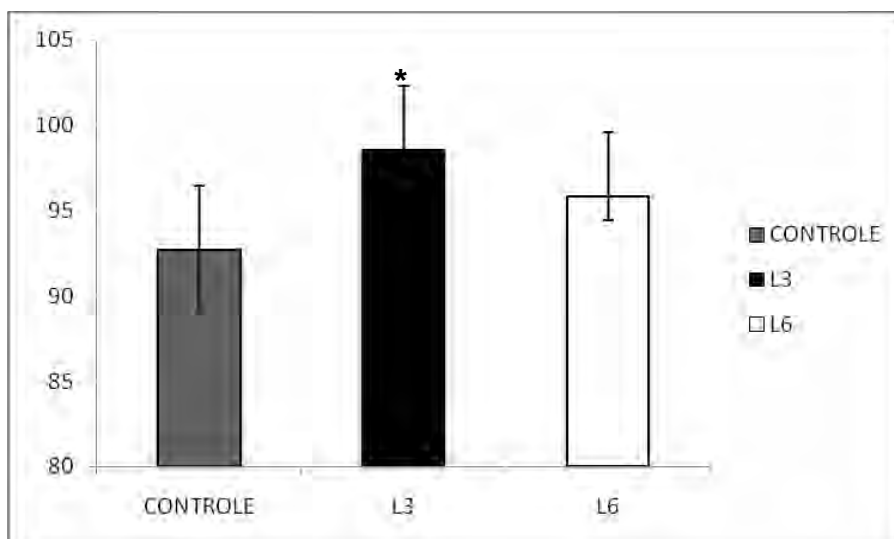
(Figura 9). Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais no período do 5º e 15º dias relacionado à contração das feridas cutâneas.

A Tabela - 2 demonstram os valores médios obtidos durante a análise macroscópica da ferida.

Tabela 2 – Valores Médios e Desvio Padrão da contração das feridas cutâneas em ratos (%) dos grupos Controle, L3 (*laser* 3J/cm²) e L6 (*laser* 6J/cm²) aos 5º, 10º e 15º dias da lesão.

Grupos	Dias da lesão		
	5º Dia	10º Dia	15º Dia
Controle	48,14±15,19 ^a	92,70 ± 3,77 ^a	96,87±3,98 ^a
L3	55,82±6,32 ^a	98,54± 0,86 ^b	98,42±1,39 ^a
L6	50,96±7,95 ^a	95,84±1,39 ^a	99,12±1,02 ^a

P=nível de significância. Letras diferentes significam resultado significativo.



Figuras 9 – Médias e desvio padrão dos grupos controle, L3 (*laser* 3J/cm²) e L6 (*laser* 6J/cm²) da contração das feridas cutâneas em ratos (%) no 10º dia da lesão (ANOVA, pós-testeTukey, p<0,05*).

4.2 Avaliação Histológica e Morfométrica

No 5º dia

No 5º dia as feridas se encontravam abertas e todas as feridas cutâneas apresentaram infiltrado inflamatório moderado de polimorfonucleares (PMN). Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros histológicos avaliados nesse período (Tabela 3).

Tabela 3 – Medianas dos processos patológicos avaliadas ao 5º dia da lesão dos grupos Controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*).

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Fibrina	1,0 ^a	0 ^a	0 ^a	0,15
Hiperemia	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	0,76
Hemorragia	1,0 ^a	1,0 ^a	2,0 ^a	0,6
Infiltrado Inflamatório (PMN)	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	0,63
Proliferação vascular	1,5 ^a	2,0 ^a	2,5 ^a	0,73

PMN=Polimorfonucleares. P=nível de significância. Letras diferentes significam resultado significativo. (Teste Kruskal-Wallis).

A análise morfométrica por planimetria digital por contagem de pontos observou-se diferença significativa entre a quantidade de vasos encontrados nos grupos L3 e L6 em relação ao controle (Tabela 4) (Figuras 10 e 11).

Tabela 4 – Medianas da quantificação de vasos avaliada por morfometria no 5º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*).

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Vasos	1,0 ^a	2,0 ^b	2,0 ^b	0,0001

P=nível de significância. Letras diferentes significam resultado significativo. (Teste Kruskal-Wallis).

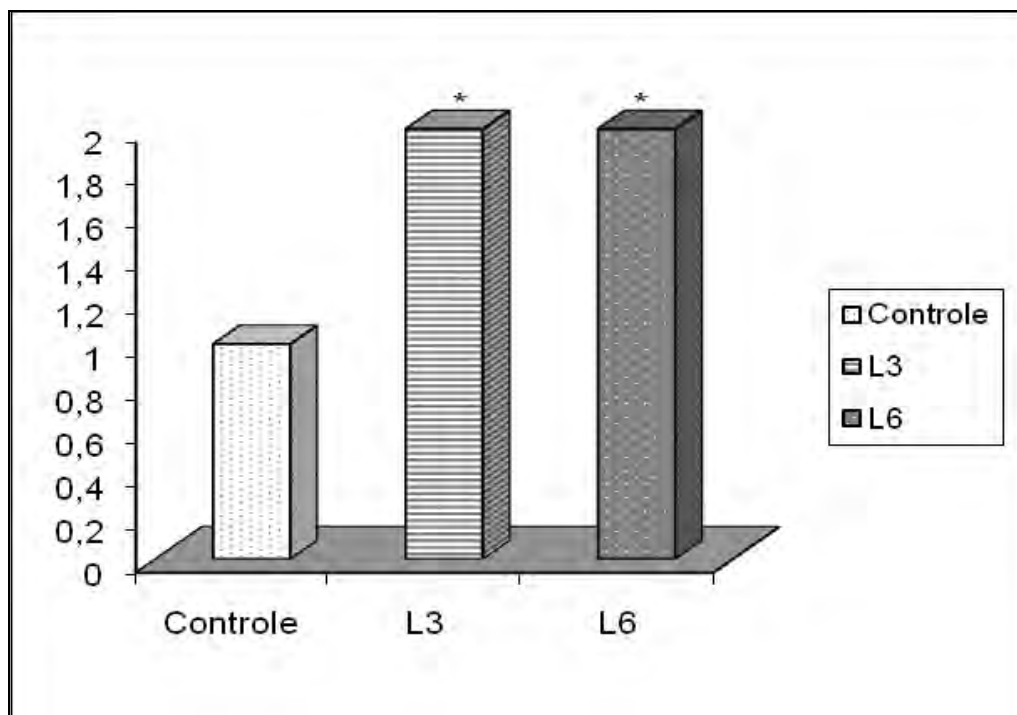


Figura 10 – Mediana da quantificação de vasos sanguíneos de feridas cutâneas em ratos dos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*) no 5º dia da lesão (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05^*$).

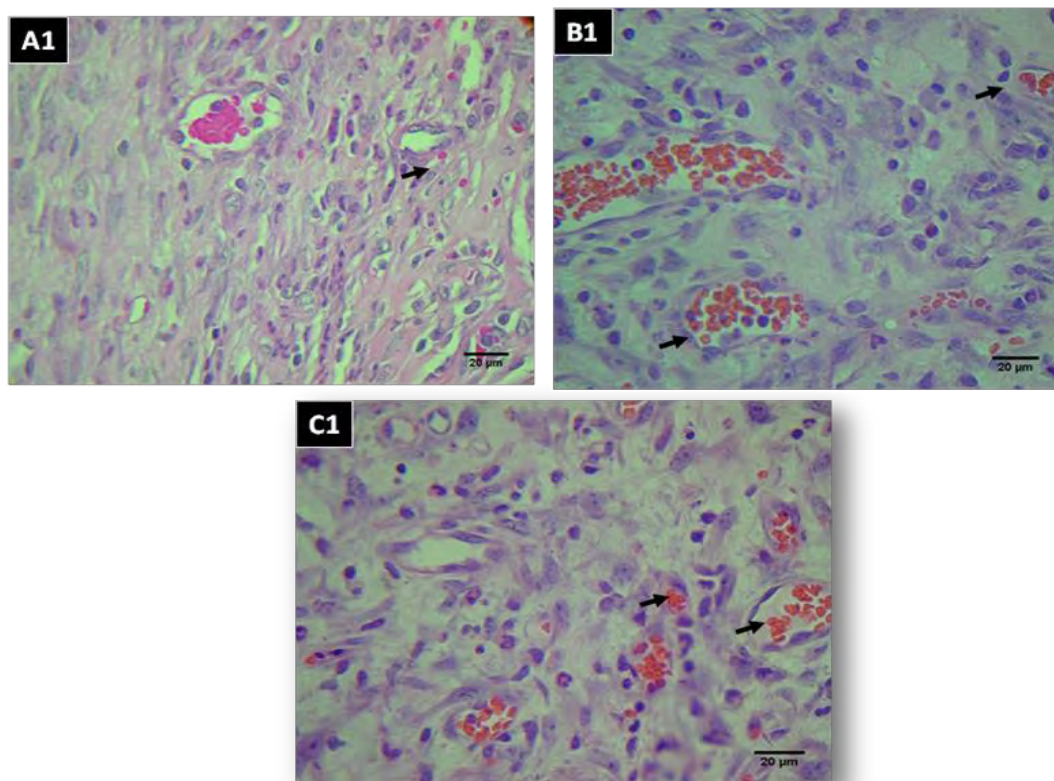


Figura 11 – Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos 5º dia da lesão evidenciando aumento de vasos (setas). Grupos controle (A1), L3 (B1) e L6 (C1) respectivamente. Hematoxilina-eosina. 20µm.40x.

No 10º dia

Ocorreu diminuição significativa na hemorragia no grupo L3 em relação ao grupo controle (Figura - 14). Nos grupos L3 e L6 observou-se uma diminuição significativa nas células PMN em relação ao grupo controle (Figura 15). Observou-se também o aumento no conteúdo de colágeno nos grupos L3 e L6 (Tabela 5) (Figuras – 12, 13,14 e 15).

Tabela 5 – Medianas dos processos patológicos ao 10º dia da lesão nos grupos Controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*)

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Fibrina	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
Hiperemia	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	0,26
Hemorragia	1,0 ^a	0 ^b	1,0 ^a	0,007
Infiltrado Inflamatório (PMN)	3,0 ^a	1,0 ^b	1,0 ^b	0,045
Colágeno	1,0 ^a	2,0 ^b	2,0 ^b	0,0003
Proliferação vascular	3,0 ^a	2,5 ^a	2,0 ^a	0,67

PMN = Polimorfoneucleados. P=nível de significância. Letras diferentes significam resultado significativo. (Teste Kruskal-Wallis).

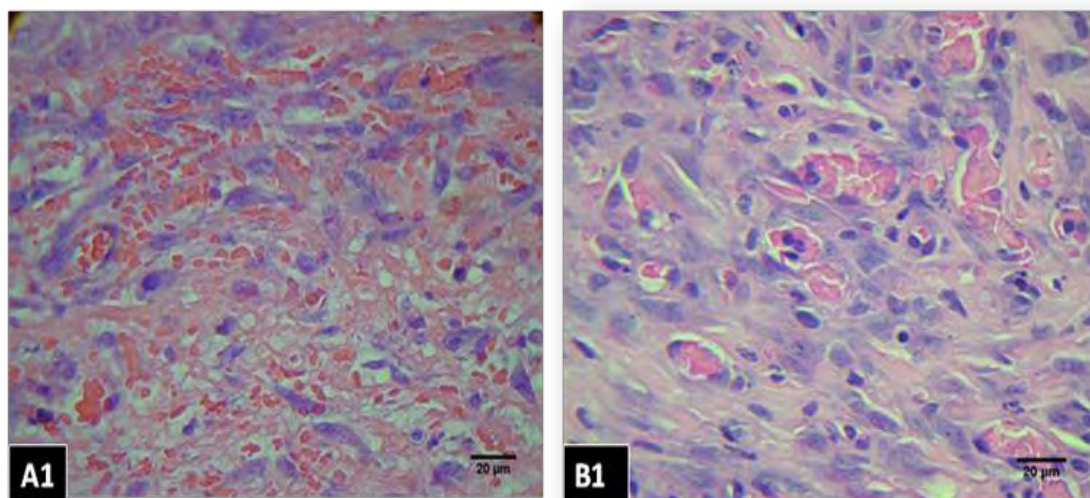


Figura 12 – Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 10º dia da lesão, evidenciando hemorragia. Grupos controle(A1) e L3(B1), respectivamente. Hematoxilina-eosina. 20µm.40x.

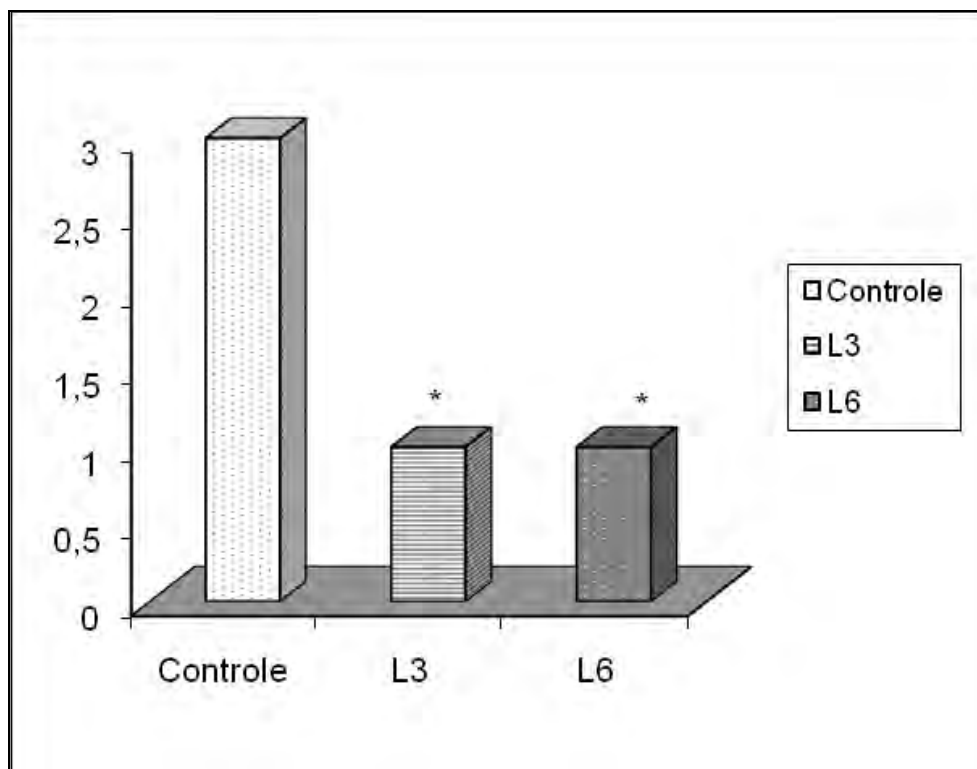


Figura 13 – Medianas de células polimorfonucleares avaliadas no 10º dia da lesão nos Grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*) (Teste Kruskal-wallis, $p < 0,05^*$).

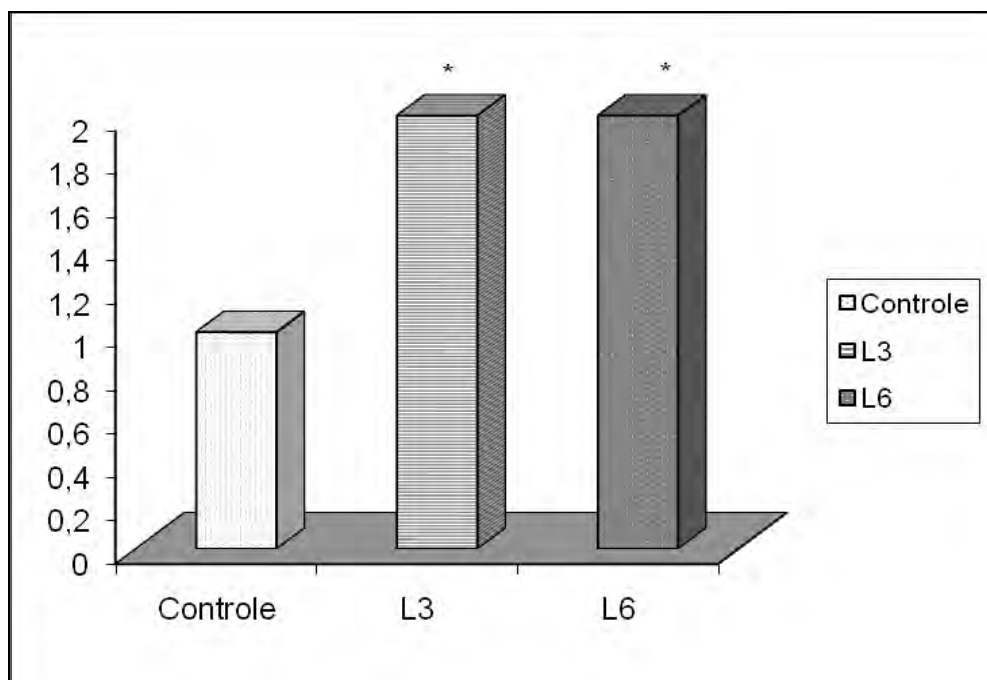


Figura 14 – Medianas do colágeno avaliado histologicamente (Hematoxilina-eosina) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6(*laser 6J/cm²*) (Teste Kruskal-wallis, $p < 0,05^*$).

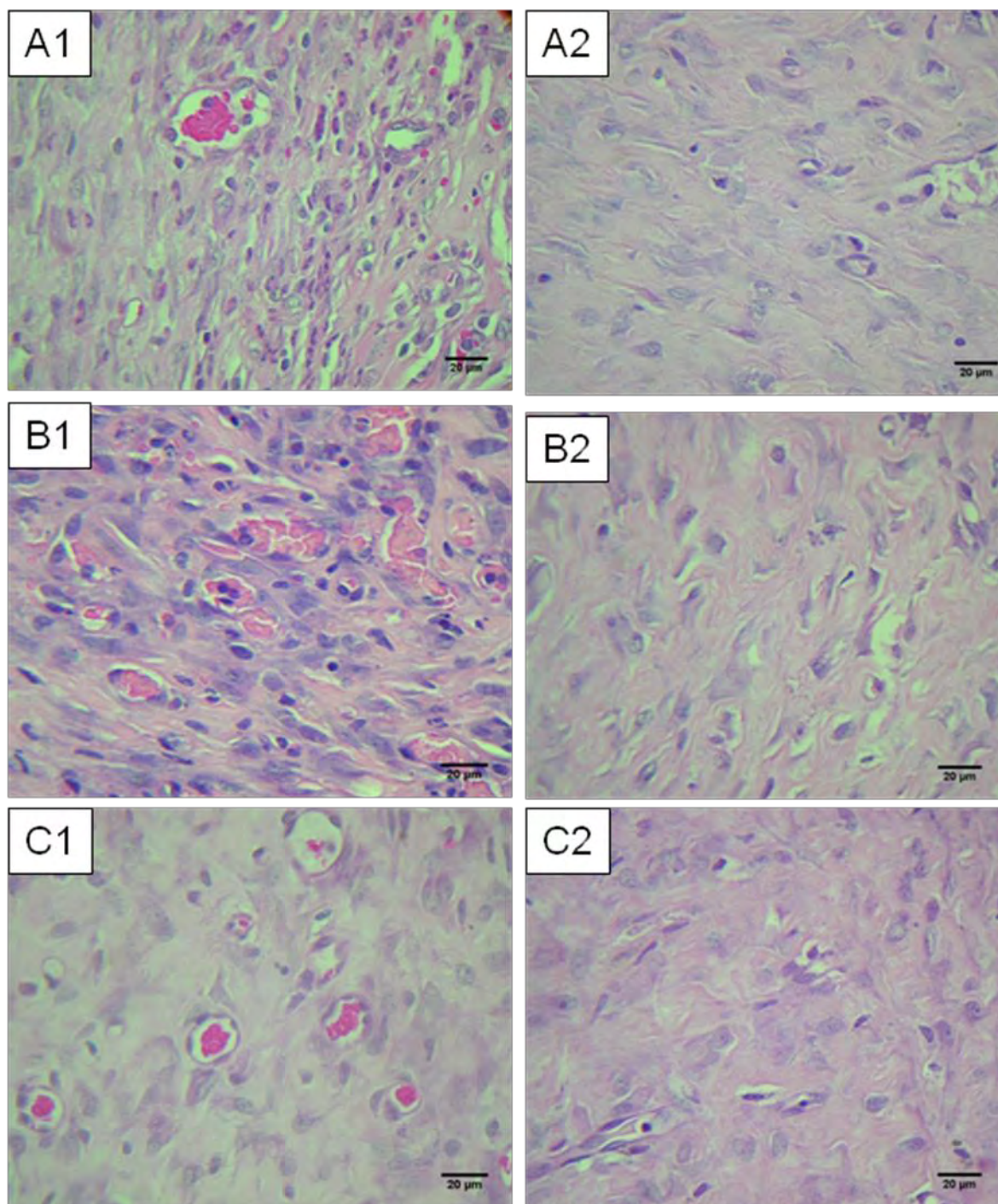


Figura 15 – Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 10 dias (A1, B1e C1) e aos 15 dias (A2, B2 e C2) da lesão evidenciando aumento do conteúdo de colágeno. Grupos controle (A), L3 (B) e L6(C) respectivamente. 50x.

Na análise morfométrica do colágeno observou-se aumento significativo nos grupos L3 e L6 em relação ao grupo controle (Tabela 6) (Figuras 16 e 17).

Tabela 6 – Medianas do colágeno avaliado por morfometria (picrossírius) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*).

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Colágeno	3,6 ^a	4,4 ^b	4,4 ^b	0,02

P=nível de significância. Letras diferentes significam resultados significativos (Teste Kruskal-Wallis).

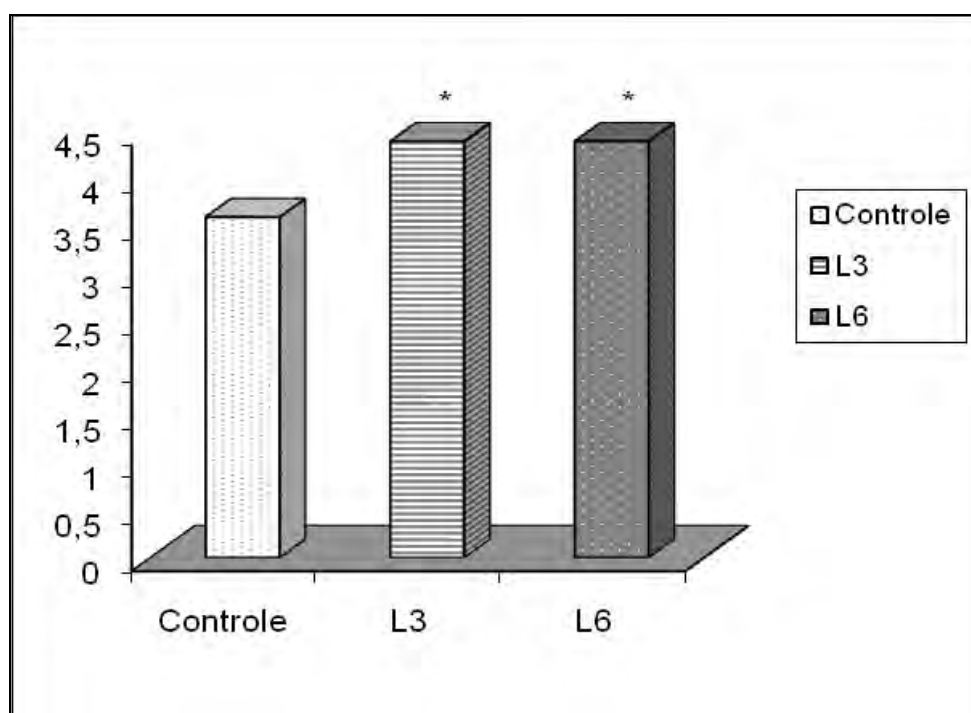


Figura 16 - Medianas do colágeno avaliadas por morfometria (picrossírius) no 10º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*) (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

No 15º dia

Observou-se cicatrização completa das feridas cutâneas nos três grupos experimentais no 15º dia da lesão. Houve diferença significativa quanto ao conteúdo de colágeno nos grupo L6 em relação ao grupo controle (Tabelas 7 e 8; Figuras 17 e 18).

Tabela 7 – Medianas dos processos patológicos ao 15º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*).

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Fibrina	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
Hiperemia	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
Hemorragia	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
Infiltrado Inflamatório (PMN)	1,0 ^a	0 ^a	0 ^a	0,39
Colágeno	1,5 ^a	0 ^a	2,0 ^b	0,034
Proliferação vascular	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	0,9

P=nível de significância. PMN = Polimorfonucleares. Letras diferentes significam resultados significativos (Teste Kruskal-Wallis).

Tabela 8 – Medianas do colágeno avaliado por morfometria (Picrossírius) no 15º dia da cirurgia nos grupos controle, L3 (*Laser 3J/cm²*) e L6 (*Laser 6J/cm²*).

Variáveis Histológicas	Controle	L3	L6	Índice de Significância (p-valor)
Colágeno	7,2 ^a	10,2 ^b	8,4 ^b	0,02

P=nível de significância. Letras diferentes significam resultados significativos (Teste Kruskal-Wallis).

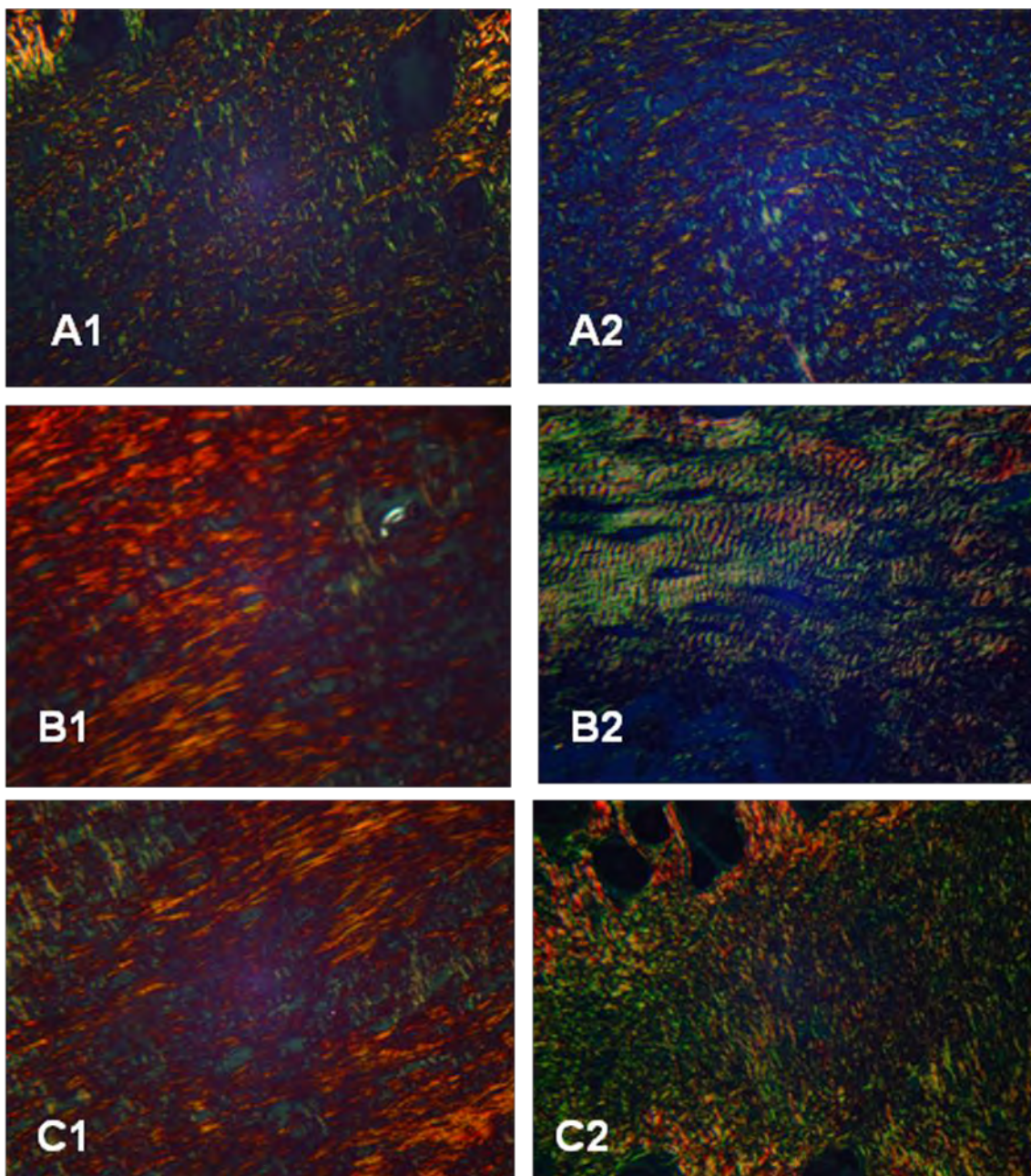


Figura 17 – Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos no 10º dia (A1, B1e C1) e 15º dia (A2, B2 e C2) da lesão evidenciando aumento no conteúdo de colágeno. Grupos controle (A), L3 (B) e L6(C) respectivamente. Picrosirius. 200x.

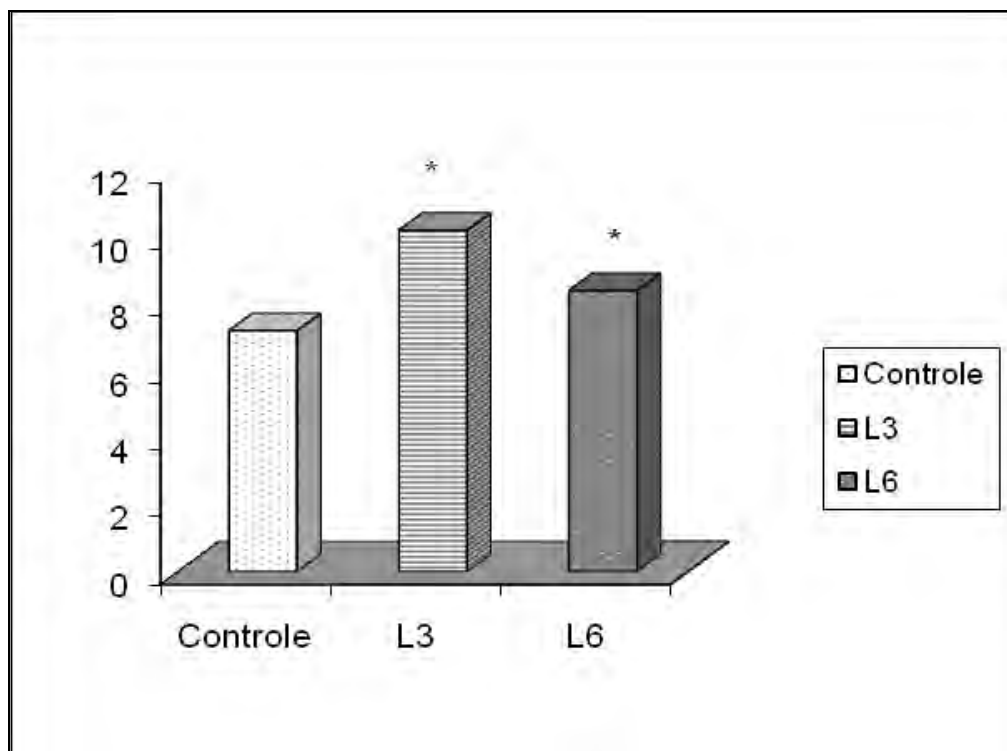


Figura 18 - Medianas do colágeno avaliado por morfometria (picrossírius) no 15º dia da lesão nos grupos controle, L3 (*laser 3J/cm²*) e L6 (*laser 6J/cm²*) (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05^*$).

5 DISCUSSÃO

Os efeitos do LBI na aceleração da cicatrização de feridas têm sido atribuídos ao estímulo de vários sistemas biológicos, como aumento da proliferação e atividade celular, aumento da síntese de DNA modulação da produção dos fatores de crescimento e redução na produção de prostaglandinas (MATERA; TATARUNAS, OLIVEIRA et al., 2003; SAKURAI; YAMAGUCHI, ABIKO, 2000). E ainda, outro estudo de meta-análise realizado para se obter os efeitos da terapia do LBI em cicatrização de feridas cutâneas, constatou-se índices específicos observados em cicatrização, como aumento da síntese de colágeno, aumento da força de resistência da cicatrização quando submetida a ensaios de tensão, redução do tempo de cicatrização, redução do perímetro e área da ferida (WOODRUFF et al., 2004).

No presente estudo o aumento na contração das bordas da ferida cutâneas no 10º dia da lesão nos grupos submetidos *laser* AlGaInP indicou efeito positivo sobre o processo cicatricial, na densidade de energia de 3J/cm². Resultados semelhantes foram encontrados em dois estudos desenvolvidos em ratos e coelhos, utilizando a mesma densidade de energia (ROCHA JUNIOR et al., 2006; Gul et al., 2007). Dessa forma, o *laser* na densidade de energia proposta atuou no fechamento da ferida cutânea induzida em um menor período de tempo.

Evidenciou-se aumento no número de vasos sanguíneos no 5º dia da lesão nos grupos irradiados por *laser*. Este achado esta de acordo com os resultados do trabalho de Walker et al.(2000) que demonstraram que a *laser* AlGaInP atuou de forma positiva na neoformação de vasos, principalmente na fase inicial de formação do tecido de granulação. Acredita-se que as células envolvidas no processo cicatricial respondam a *lasers* que atuam na faixa espectral vermelho, principalmente no estímulo angiogênico (ARAÚJO et al.,2007; ANDRADE et al., 2010). Dessa forma, o neoformação vascular observada nesse trabalho, pode estar diretamente relacionada à atividade do *laser* utilizado.

Ocorreu diminuição no número de polimorfonucleares e da hemorragia no 10º dia da lesão nos grupos tratados com *laser*. Observou-se que o LBI aumentou o número e a atividade dos polimorfonucleares sobre bactérias e promoveu maior fagocitose sobre os detritos teciduais. Admite-se que a fotomodulação estimulou aumento inicial no número das células inflamatórias, removendo rapidamente o

excesso de detritos, posteriormente reduzindo o número destas células, dinamizando a produção de fatores de crescimento para as fases seguintes (PUGLIESE et al., 2003). Os efeitos evidenciados nesse trabalho quanto aos polimorfonucleares e a hemorragia, possivelmente ocorreram devido a um efeito positivo sobre a fase da inflamação, etapa inicial da cicatrização, como evidenciado em outros trabalhos (MARCON; SANFELICE, 2005; HOSGOOD, 2006).

A fase proliferativa precede o tecido cicatricial maduro, tendo seu início por volta do 3º ou 4º dia da lesão, sendo que em torno do 14º dia, atinge seu pico máximo (ROCHA JUNIOR et al., 2006).

Há indicações que o *laser* estimule a transformação precoce de fibroblastos em miofibroblastos (HAWKINS; HOURELD, ABRAHAMSE, 2005).

Observou-se que a derme irradiada apresentou alto número de fibroblastos e nestes inúmeras vesículas de colágeno em seu citoplasma e retículos endoplasmáticos bem desenvolvidos, indicando maior atividade fibroblástica em comparação ao grupo controle (ARAÚJO et al. 2007). Evidenciou-se aumento na produção de fator de crescimento de fibroblasto (FGF) nas feridas de ratos irradiados (BYRNES et al.2004).

De forma semelhante Reddy (2003), examinou o efeito da irradiação do *laser* As-Ga (904nm - 7mW - 1J/cm - 5 dias por semana durante 3 semanas) em feridas no dorso de ratos diabéticos tendo sido promovido um aumento de 14% na deposição de colágeno em ratos diabéticos comparados aos não-irradiados.

Carvalho et al. (2006) realizaram uma análise morfométrica do percentual das fibras colágenas, por densidade de cor, nas cicatrizes de 48 ratos. Utilizaram o *laser* HeNe com dosagem de 4 J/cm² no período de 3, 7 e 14º dias da lesão. Observaram aumento significativo no percentual de colágeno do 3 ao 7º dia da lesão e uma desaceleração no percentual de colágeno no 14º dia. Já nesse estudo observou-se um aumento na produção do colágeno no 10º e 15º dia da lesão porem uma evidente maturação das fibras de colágeno.

Estudo realizado por Rocha Junior et al. (2006), para investigar o comportamento de feridas cutâneas em ratos que foram submetidos ao tratamento com LBI, observou-se que foi eficaz na cicatrização tecidual verificada em modelo experimental de feridas cirúrgicas realizadas em ratos. Esse tipo de laserterapia mostrou efeitos positivos, acelerando a proliferação tecidual, aumentando a vascularização local e formando um tecido de granulação mais organizado.

Pugliese *et al.* (2003) em seus estudos demonstraram que os efeitos da irradiação por *laser* nas primeiras 72 horas é maior em relação às fibras elásticas e de colágeno em ratos, e observaram que os animais irradiados tiveram uma redução no edema e no infiltrado inflamatório.

A terceira e última fase do processo cicatricial é conhecida como remodelamento ou reparo e é caracteriza-se por substituição da matriz extracelular. Na proporção em que o tecido cicatricial amadurece o colágeno (maduro) aumenta gradativamente e o (imaturo) vai sendo absorvido (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Tatarunas, Matera e Dagli (1998), constataram que no 15º dia da lesão, com o tratamento utilizando o *laser* AsGa, houve completa revascularização das feridas cirúrgicas, esses dados estão condizentes com nossos estudos, onde observamos um efeito positivo do *laser* no 15º da lesão com o aumento do colágeno. Estudos realizados evidenciaram que a aplicação precoce da laserterapia sobre as feridas mostrou-se capaz não só de acelerar o fechamento das mesmas, provocando efeitos na fase inflamatória e proliferativa, mas de estimular um processo cicatricial mais harmônico e organizado (HAWKINS; HOURELD, ABRAHAMSE, 2005).

A dose do *laser* responsável pelo efeito cicatrizante deve situar-se entre 3 e 6J/cm² (TAVARES; MAZZER, PASTORELLO, 2005). Na *laser*terapia, a densidade de energia é utilizada como forma de dosar a quantidade de radiação que se administrará a um paciente (BJORDAL *et al.*, 2003). Estudos realizados sobre doses com fins terapêuticos específicos, relataram que a densidade de energia recomendada em *laser*terapia para promover aumento no número de fibroblastos, fibras colágenas, incremento vascular e reepitelização deve se situar entre 1 e 5J/cm² (MATERA; DAGLI, PEREIRA, 1994; KITCHEN, 2003). Porém em um estudo realizado por Marcon e Sanfelice (2005) com o *laser* Alumínio–Gálio–Índio–Fósforo (AlGaInP) observou-se que o tempo de cicatrização dos animais irradiados é menor do que os não irradiados, provocando redução do processo inflamatório e infeccioso, sem distinção entre uma dose e outra. No presente estudo também não houve consideráveis diferenças entre uma dose e outra.

Estudos avaliaram o efeito do *laser* em diferentes comprimentos de onda e intensidades de energia utilizadas em *laser*terapia, por sete dias consecutivos em cicatrização de feridas cutâneas e constataram que o LBI produz biomodulação positiva e é mais efetivo quando combina alta intensidade com menor comprimento

de onda ou baixa intensidade com maior comprimento de onda (SAY, 2003; NASCIMENTO et al., 2004). Nesse estudo o comprimento de onda foi de 660nm, com uma potência de saída de 30mW, e densidades de energia baixas e 3 e 6 J/cm², o que corresponderia a um menor tempo de estimulação devido a um comprimento de onda e potência de saída maiores, não sendo necessário expor o tecido a densidades de energia maiores e com maior tempo de terapia, o que justificaria o uso do *laser* AlGaInP no estudo e não outro tipo de *laser*.

Considerou-se no presente estudo que a análise imunohistoquímica para observação do FGF, rotineiramente citada na literatura com um enorme benefício produzido pelo *laser* poderia ter sido investigada para uma melhor evidência no aumento do conteúdo de colágeno encontrado.

Outro ponto que também poderia ter sido utilizado para melhor padronização da técnica seria a análise também do tecido removido, pois assim poderíamos afirmar fidedignamente quais camadas da pele foram removidas. Sabe-se que o tipo de laser utilizado nesse estudo penetra ate 2mm da pele ou seja lesões superficiais e não profundas.

Sugere-se para pesquisas futuras a inclusão desses parâmetros para uma melhor resposta a técnica estabelecida.

6 CONCLUSÃO

O *laser* de baixa intensidade diodo Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP) apresentou um efeito positivo sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas em ratos. Foi capaz de estimular neoformação vascular na fase inicial do processo, reduziu a resposta inflamatória, devido à diminuição das células polimorfonucleares e hemorragia, e estimulou a fibroplasia.

Ambas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $6\text{J}/\text{cm}^2$ demonstraram ser importantes na fase inicial da lesão para resolução do processo inflamatório e um rápido avanço para fase proliferativa através da fibroplasia.

Admite-se que o *laser* utilizado nesse trabalho para o tratamento de feridas cutâneas em ratos, possuiu parâmetros compatíveis para uma melhor resolução e fechamento completo da lesão, observado principalmente no 10º dia da lesão (fase proliferativa).

REFERÊNCIAS

1. Agne, JE. Eletrotermoterapia: teoria e prática. 2. ed. Santa Maria: Orium, 336 p. 2005.
2. Albertini R, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira S, Nucci G, Faria Neto HCC, Aimbire FSC, Zangaro RA, Martins RABL. Análise do efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. *Fisioterapia Brasil*, 3 (1): 5-15, 2002.
3. Allendorf JDF, Bessler M, Huang J, Kayton ML, Laird D, Nowygrod R, Treat M R. Helium-Neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength, *Laser Surg Med*, 20: 340-345, 1997.
4. Andrade AG, Lima CF, Albuquerque AKB. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica *Rev Bras Queimaduras*. 2010; 9(1):21-30.
5. Araújo CEN, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TMT. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne lasertreated wounds. *J Photochem Photobiol B*, 86:87-96, 2007.
6. Assunção D, Stall KR, Castilho LV, Amorim, MHPB, Palma M, Fonseca PB, Menon VB. Tratamento fisioterapêutico da acne por meio do laser. *Fisioterapia em Movimento*, Curitiba, v. 16, n. 4, p. 11-16, out./dez. 2003.
7. Bayat M, Kamali F, Dadpay M. Effect of low-level infrared laser therapy on large surgical osteochondral defect in rabbit: a histological study. *Photomed Laser Surg*. 2009 Jan 26. [Epub ahead of print]
8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1): 27-51, 2005.
9. Baxter GD. *Therapeutic Lasers: Theory and Practice*. Ed. Churchill Livingstone, United States of America, 164-172, 1997.
10. Beheregaray, WK, Gianotti GC, Leal JS, Monteiro FM, Simas SM, Elizeire M, Contesini EA. Uso do Laser ALGaInP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(3): 237-243, 2010.
11. Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, Miracco C, Johnson B, Anders JJ. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2004;22(4):281-90.
12. Biondo-Simões MIP, Alcantra EM, Dallangnol JC. Cicatrização de feridas: estudos comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. *Rev Col Brasil Cir*, 33 (2):74-8, 2006.

13. Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low level Laser therapy with location-specific doses for pain from chronic disorders. *Austr J Physioter*, 49:107-16. 2003.
14. Candido LC. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: SENAC, 2001.
15. Carvalho PTC, Mazzer N, Corazza AV, Raduam RM. Os Efeitos do Laser de Baixa Intensidade em Feridas Cutâneas Induzidas em Ratos com Diabetes Mellitus Experimental. *Fisioterapia Brasil*, 2: 241-246, 2001.
16. Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JFR, Ferreira JVL, Silva IS. Análise de Fibras Colágenas Através da Morfometria omputadorizada em Feridas Cutâneas de Ratos Submetidos a Irradiação do Laser HeNe. *Fisioterapia Brasil*, 4: 253-258, 2003.
17. Carvalho PT, Mazzer N, dos Reis FA, Belchior AC, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21(3):177-83.
18. Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level Laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med*, 37:46-52, 2005.
19. Chor A, De Azevedo AM, Maiolino A, Nucci M. Succesful treatment of oral lesions of chronic lichenoid graft-vs.-host disease by addition of low-level Laser therapy to systemic immunosuppression. *Eur.J. Haematol.*, Copenhagen, 72(3): 222-224, Mar. 2004.
20. Damante CA. "Avaliação clínica e histológica dos efeitos de Laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização após gengivoplastia em humanos". Dissertação de Mestrado em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Bauru – Bauru, 2003
21. Dealey C. Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras. São Paulo, Atheneu Editora, 2ª edição, capítulo 3: p. 49-65, capítulo 4: p. 68-89; cap. 9: p. 200-207, 2001
22. Fazio MJ, Zitelli JA, Goslen JB. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. *Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 18-23, 2000.
23. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB. Rohnelt Machado de Oliveira⁶, Elaine Cristina de Moraes Arruda⁵ Extrato de *Passiflora Edulis* na Cicatrização de Feridas Cutâneas Abertas em Ratos: Estudo Morfológico e Histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira* – 21 (3): 55, 2006.
24. Gul NY, Topal A, Cangul T, Yanik K. Effect of TCC and laser on wound healing. *Veterinary Dermatology*. 19 (Suppl 1): 7-14, 2007.

25. Guirro E, Guirro R. Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos, patologias. 3. Edição, São Paulo: Manole, 2004.
26. Gutknecht N, Franzen R. O Laser: função, interação e segurança. In: Eduardo C P, Gutknecht NA. Odontologia e o Laser. São Paulo: Quintessence, p. 25-60, 2004.
27. Hawkins D, Hourel N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci*, 1056:486-93, 2005.
28. Hosgood G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *Vet. Clin. Small Anim. Pract.*, 2006.36:667-85.
29. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, David BG. Low-level Laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train, Dallas*, 39: (3): 223-229, Sept. 2004.
30. Hosgood G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Vet Clin Small An. Practice* 36: 667-685, 2006.
31. Kreisler M, Christoffers AB, Willerstausen B, D'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs Laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol. Copenhagen*, 30(4): 353-358, Apr. 2003.
32. Krishnan P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v. 17, issue 1-2, p.21-27, 2006.
33. López De Leon NA, Rojkind, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33:737-43, 1985.
34. Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. Tradução Lilia Breternitz Ribeiro. 3. ed. São Paulo: Manole, 2001.
35. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 258p., 1968.
36. Mandelbaum SH, DI Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização – conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *An Bras Dermatol* 78(4): 393-410, 2003.
37. Marcon K, Sanfelice AE. Efeitos do Laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. *Rev Fisio da FURB*, Vol. 1, No. 1, Fev/ 2005.
38. Matera JM, Tatarunas AC, Oliveira SM. "Uso do Laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães." *Acta Cirúrgica Brasileira*, 18(2), 2003.

39. Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):47-54.
40. Mester AF, Jaszszagi-Nag IE. The effect of Laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophys.* 35:227-30,1973.
41. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of Laser application. *Lasers Surg. Med. New York*, 5 (8): 31-39, Nov. 1985.
42. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 1031–1037, 2004.
43. Moura CEM, Silva LLM, Godoy JRP. Úlceras De Pressão: Prevenção e Tratamento de Úlceras de pressão: prevenção e tratamento Univ. Ci. Saúde, Brasília, 3 (2): 275-286, jul./dez. 2005.
44. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG, Manfron MP. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, 7 (1): 61-5, 2000.
45. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC. Parizzoto NA. Laser de Baixa Intensidade: efeito sobre os tecidos biológicos – Parte 2. *Fisioterapia Brasil*, 2 (6): 337 – 352. Nov/dez. 2001b.
46. Pachaly JR. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JI. (Orgs.). *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 480p, 2006.
47. Parente LML, Silva MSB, Brito LAB, Lino-Júnior RS, Paula JR, Trevenzol LMF, Zatta DT, Paulo NM. Efeito Cicatrizante e Atividade Antibacteriana da *Calendula Officinalis* L. Cultivada No Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, V.11, N.4, P.383-391, 2009.
48. Parizotto NA. Laser de Baixa Intensidade: Efeitos sobre os Tecidos Biológicos - Parte 2. *Fisioterapia Brasil*, 2: 337-352 2001.
49. Prado FA, Ambinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balducci I. Defeitos ósseos em tibias de ratos: padronização do modelo experimental. *Rev. Odontol.USP* 2006, 18:7-13.
50. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level Laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui. Odontol. Bras.*, São Paulo, 17 (4): 307- 313 out./dez. 2003.
51. Ramey DW, Basford, JR. Laser Therapy in horses. In: *Comp. Cont. Educ* 22: 263-71, 2000.

52. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):344-51.
53. Ribattil D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F.. The chick embryo membrane as model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Current. Pharm. Biotechnol.* 2000, 1:73-82.
54. Ribeiro MS. Curso clínico de Laser em odontologia. Apostila de curso FUNDECTO-USP, São Paulo, 2001.
55. Ribeiro MS, Da Silva DF, De Araujo CE, De Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM. Effects of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin light microscopy study. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, New York, 22 (1): 59-66, Feb., 2004.
56. Rocha Junior AM, Andrade LCF, Oliveira RG, Aarestrup FM, Farias RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a Laser de Baixa Intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*, 81(2): 150-6, 2006.
57. Rodrigues EM, Guimaraes CS. Manual de recursos fisioterapêuticos. Rio de Janeiro: Revinter, p.1-5, 1998.
58. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária p. 221, 1998.
59. Say K, Gonçalves R, Rennó A, Parizotto N. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da Laserterapia com dois comprimentos de onda. *Rev. Fisioterapia Brasil*, 4 (1): 39-47, 2003.
60. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low -Intensity Laser Therapy: A Review. *Journal of Investigative Medicine*, 48: 312-326, 2000.
61. Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy, *Photomed Laser Surg*, 23(1): 78-80, 2005.
62. Sinclair RD, Ryan TJ. A great war for antiseptics. *Wound Mangement*, 4(1):16-18, 1993. SA. Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas, cap.9: p. 101-109. São Paulo: Atheneu, 2003.
63. Tayar G, Peterlini MAS, Pedreira MLG. Proposta de um algoritmo para a seleção de coberturas, segundo o tipo de lesão abertas em crianças. *Acta Paulista de enfermagem*, São Paulo, 20 (3): 284-290, Mar. 2007.
64. Tatarunas AC, Matera JM, Dagly MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do Laser de baixa potência GaAs (904 nm). *Acta Cir Bras*, 13(2), 1998.

65. Tavares M, Mazzer N, Pastorello M. Efeito do Laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. Rev.Fisio Brasil, 6 (2): 96-100, 2005.
66. Ty Hopkins J, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter GD. Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. Journal of Athletic Training, 39: 223-229, 2004.
67. Tünér J; Hode L. Low Level Laser Therapy. Clinical Practice and Scintific Background. Spjutvagen, Suécia: Prima Books, p. 393, 1999.
68. Veçoso MC. Laser em fisioterapia. São Paulo: Lovise, 1993.
69. Walker RMD, Rumpf S, Baxter D, Hirst DG, Lowe AS. Effect of Low- Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin. Lasers in Surgery and Medicine, 26:41- 47, 2000.
70. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of Laser therapy in wound repair: a meta analysis of the literature. Photomed. Laser Surg., Larchmont, 22 (3): 241-247, June 2004.
71. Zezell DM. Curso clínico de Laser em odontologia. Apostila do curso FUNDECTO, São Paulo: USP, 2001.
72. Zimmerman LM, Veith I. Great ideas in the History. Baltimore, Wilkins & Wilkins Co, 1961.
73. IMAGE J. Image Processing and Analysis in Java v.1.33. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 28 Maio, 2010.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS

PROTOCOLO Nº
030/10

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino)

A finalidade do presente projeto de pesquisa é de analisar a atividade cicatrizante em feridas cutâneas induzidas em ratos utilizando *laser* argainp em diferentes densidades de energia.

II - Identificação:

☐ Título do projeto:

Análise da atividade cicatrizante em feridas cutâneas induzidas em ratos utilizando *laser* argainp em diferentes densidades de energia.

☐ Pesquisador(es) Responsável(veis):

☐ Kelly Cristina Borges Tacon Santos

☐ Instituição onde será realizado:

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

☐ Data de apresentação ao CEEA:

26/02/2010

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Estudos demonstraram que o efeito cicatrizante da *laser*terapia ocorre devido ao estímulo à microcirculação e à angiogênese, e a maior produção de fibras de colágeno (TAVARES; MAZZER, PASTORELLO, 2005). Estudos realizados com o *Laser* Arsenieto – Gálio- Índio- Fósforo (ArGaInF) comprovam que o tempo de cicatrização dos animais irradiados é menor dos que os não radiados, provocando redução do processo inflamatório e infeccioso, sem distinção entre uma dose e outra (MARCON & SANFELICE, 2005).

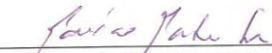
Para tanto diante dos efeitos fisiológicos do *laser* sobre o processo cicatricial, o principal objetivo deste estudo é analisar a atividade cicatrizante em feridas cutâneas induzidas em ratos utilizando *laser* argainp em diferentes densidades de energia.

Os animais serão sacrificados em câmara de CO₂, acondicionados em embalagens adequadas, encaminhados ao Setor de Patologia da Escola de Veterinária, UFG, para serem incinerados.

V - Parecer do CEEA/CEP:

Ao analisar o projeto de pesquisa "Análise da atividade cicatrizante em feridas cutâneas induzidas em ratos utilizando *laser* algaín em diferentes densidades de energia", o parecer é **Aprovado** salvo melhor juízo deste comitê.

VI - Data da reunião: 03/05/2010


Mauricio Martinez Sales
Coordenador do CEP/PRPPG/UFG

**Anexo 2 – Artigo - Healing Activity of do laser AlGaInP (660nm)
in rats**

Healing Activity of do laser AlGaInP (660nm) in rats¹

Atividade Cicatrizante do laser AlGaInP (660nm) em ratos

Kelly Cristina Borges Tacon ^{I1*}, Luiz Carlos da Cunha^{II}, Leila Maria Leal Parente^{III}, Hugo Campos Oliveira Santos^{IV} Ruy de Souza Lino-Júnior^V

ABSTRACT

Purpose: In this work the healing activity of diode laser Aluminum Indium Gallium Phosphorus was evaluated in skin wounds induced in rats, whereas positive about the healing property has been attributed to laser therapy, yet few studies have been developed with this type of recent laser which is widely used by health professionals.

Methods: We used a model of induced skin wounds in rats. We evaluated macroscopic and histological lesions in the days 5th, 10th and 15th days after wounding. Morphometric assessments of angiogenesis and collagen content were also performed. **Results:** The wound healing activity AlGaInP laser was evidenced by increased angiogenesis, decreased inflammation and stimulation of fibroplasia.

Conclusion: We conclude that the AlGaInP laser stimulated the healing of skin wounds in rats.

Key words: Wound healing. Laser Therapy, Low Intensity. Rats.

¹Research performed at Departments of Toxicology, Toxic-pharmacological studies and research Laboratory, Federal University of Goiás (UFG), Brazil.

^I Master, Postgraduate Program in Health Sciences, Department Toxicology, Federal University of Goiás (UFG), Goiás, Brazil. *Conception and design, data acquisition, statistical analysis and interpretation, manuscript writing.*

^{II} PhD, Full Professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, UFG, Goiás, Brazil, *Conception and design, intellectual and scientific content of the study, critical revision.*

^{III} PhD in Animal Science, Department of Pathology, Veterinary School, UFG, Goiás, Brazil. *Conception and design, Involved in technical procedures and manuscript writing.*

^{IV} Master, Postgraduate Program in Health Sciences, Department Toxicology, Federal University of Goiás (UFG), Goiás, Brazil. *Conception and design and Involved in technical procedures.*

^V PhD, Assistant Professor, Department of General Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, UFG, Goiás, Brazil. *Morphometric analysis, statistical analysis, technical procedure.*

RESUMO

Objetivo: Neste trabalho a atividade cicatrizante do laser diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo, foi avaliada em feridas cutâneas induzida em ratos, visto que propriedade positiva sobre a cicatrização tem sido atribuída à laserterapia, no entanto poucos estudos foram desenvolvidos com esse tipo recente de laser, que é muito utilizado pelos profissionais de saúde. **Métodos:** Foi utilizado o modelo de feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar. Foram avaliados aspectos macroscópicos e histológicos das lesões nos tempos 5, 10 e 15 dias após a lesão. Avaliações morfométricas da angiogênese e do conteúdo de colágeno também foram realizadas. **Resultados:** A atividade cicatrizante do laser AlGaInP foi evidenciada pelo aumento da angiogênese, diminuição da inflamação e estímulo da fibroplasia. **Conclusão:** Conclui-se que o laser AlGaInP estimulou a cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Descritores: Cicatrização de Feridas. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Ratos.

Introduction

The healing of a wound consists of the reconstruction of the injured site in order to restore its integrity and normal function. It is a dynamic process where events are involved cellular, molecular and biochemical tests, which take place in a superimposed and interconnected. Changes in wound healing may present a high cost to society, and also decrease the quality of life for millions of people worldwide. Thus, attention has turned to the investigation of effective therapeutic strategies, and affordable alternatives that might work in this process¹.

Effects of low intensity laser on healing have been developed, checking analgesic, antiinflammatory and cicatrizante². The low intensity laser therapy is a generic term that defines the application of laser therapy with relatively low power (less than 500mW)³.

Among these types is the laser aluminum-gallium-indium-phosphorus (AlGaInP), which due to its power output of 30 mW, can reduce the stimulation of the irradiated site compared with other lasers such as helium-neon (He-Ne) and gallium arsenide (GaAs)⁴.

However, being a relatively new type and already widely used by health professionals, yet few studies have been done on the activity of this type of laser on

the healing process. Thus, in this paper the effect of AlGaInP laser was evaluated by the model of skin wounds induced in rat at days 5, 10 and 15 days.

Methods

Experimental animals

The sample consisted of 54 young females albino Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), with body weight ranging from 160 ± 20 g. Animals came from the Animal Colony of the Federal University of Goiás (UFG), Goiania-GO, Brazil. Animals were adapted at the Experimental Surgery of the Studies and Research Toxic Pharmacological, UFG, for a period of fifteen days, and kept in individual polyethylene cages covered with coarse sawdust, under controlled environmental conditions (temperature at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of air at 50-70%, and 12-hour-light/dark photoperiod). Water and ration were supplied *ad libitum*.

All experimental procedures were carried out in accordance with the norms of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The experimental protocol with the animals used in this study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Goiás, under protocol number 030/2010/CEA/UFG.

Rat's cutaneous wound model

The animals were weighed and randomly assigned to three groups of eighteen animals and subsequently subdivided into six animals in each group and subjected to treatment: GC - physiologic solution control group (0.09%), L3 - 660nm AlGaInP laser-treated, energy density $3\text{J}/\text{cm}^2$ and physiologic solution (0.09%); L6 - 660nm AlGaInP laser-treated, energy density $6\text{J}/\text{cm}^2$ and physiologic solution (0.09%).

To induce the wounds, a circular metal punch (1cm diam) was used in the dorsocervical region of each animal. The anesthesia consisted of the administration intramuscular injection of ketamine (70 mg/Kg, IM) and xylazine (10mg/Kg, IM) as modified model Parente *et al.*⁵

Laser Irradiation

Diode laser tag InGaAlP (IBRAMED – LASERPULSE) with continuous output power of 30 mW, wavelength (λ) 660 nm (visible red), continuous mode, the

spot size was 0,030 cm², the energy densities of 3J/cm² and 6J/cm². After 24 hours post-operatively (PO), on alternate days and at the same time, the wounds were irradiated with laser energy densities of 3J/cm² (L3) or 6J/cm² (L6). The control group, despite not having been irradiated, were contained by the same amount of time that animals in groups L3 and L6. After irradiation, 0.1 mL was instilled physiologic solution and into the wounds of animals of all groups.

At 5, 10 and 15 days postoperatively the animals were euthanized in a CO₂ chamber, the collection of fragments of skin in the area of the wound. The fragments were preserved in 10% buffered formalin.

Macroscopic analysis

All animals were examined daily for general appearance, at which time they proceeded to macroscopic evaluation of the wound, observing the presence or absence of bleeding, exudate and crust, and the data recorded on individual sheets. For the morphometric analysis, the wounds were photographed on 0,5,10 and 15 days after the surgery using a digital camera mounted on a tripod, kept at a constant distance of 15 cm from the wound, and then the images were digitized on a microcomputer with the aid of Image J Software 1.3.1 (NIH, USA). The degree of contraction of the wound area was calculated using the formula proposed by Oliveira *et al.*⁶

Histologic and Morphometric analysis

The preparation of histological slides, photomicrographs, the morphometric analysis and digital planimetry by point counts were performed by the same researcher. The number of fields in each sample photographed for morphometric analysis and digital planimetry by point counting was determined by cumulative average.

For histological evaluation, a fragment of each wound was removed, fixed in formalin 10% buffered, processed and stained with hematoxylin and eosin (HE). We also used special staining Picrossírius for quantification of collagen under polarizada⁷ light, calculating the percentage of area marked in green or reddish-yellow by field, using the software Image J 1.3.1 (NIH, USA).

At histologic examination on days 5, 10 and 15 days after surgery were evaluated variables fibrin, hemorrhage, hyperemia, inflammatory infiltration,

reepithelialization epithelial hyperplasia. Scores were adopted adapted Biondo-Simões *et al.*⁸ where:

- Fibrin, hemorrhage, hyperemia and inflammatory infiltrate scores were used absent (0), mild (1-25%), moderate (25-50%) and severe (above 50%) assessed at 5 and 10 days after surgery.

For the epidermal hyperplasia used the same scores as assessed on 15 days after surgery.

- Reepithelialization is used the partial or total scores, assessed on the 15 days after surgery day.

Counting the number of blood vessels in the skin tissue was performed using planimetry by point counting with the aid of Image J software 1.3.1 (NIH, USA). A square lattice composed of 25 points was superimposed on the histological picture and the vessels were counted only at intersections present in the visual field, as the models proposed by Ribatti *et al.*⁹ and Prado *et al.*¹⁰.

Statistical analysis

The results were analyzed statistically using the GraphPad InStat (Version 3.5 for Windows). From the Kolmogorov-Smirnov test for normality, parametric variables were evaluated by ANOVA and Tukey post-test and the nonparametric Krukal-Wallis test and then by Dunn post-test. The significance level was $p < 0.05$.

Results

Macroscopic analysis

Surgical procedure and treatment was uneventful. All animals recovered well from anesthesia, showing good general health, physical activity and normal behavior for the species. Purulent exudate was not observed in any of the wounds. The wound area decreased gradually with the progress of the healing process in the three experimental groups.

The crusts began to form the 2nd day after injury, while in the treated group L3 and L6 were more thick and dry in the control group, where they were more moist. From the 10 days after surgery were not observed the presence of crusts in the groups treated with laser energy densities 3J/cm² and 6J/cm². In the control group, treated only with physiologic solution, were seen to be hyperemic and crusty. On the 15 days after surgery was observed complete healing of wounds in all experimental groups.

There were significant differences between the control group and L3 on 10 days after surgery, indicating that the laser energy density $3\text{J}/\text{cm}^2$ acted positively in the contraction of skin wounds, benefiting the centripetal contraction (Figure 1). There was no significant difference in any of the experimental groups during the 5 and 15 days related to the contraction of skin wounds.

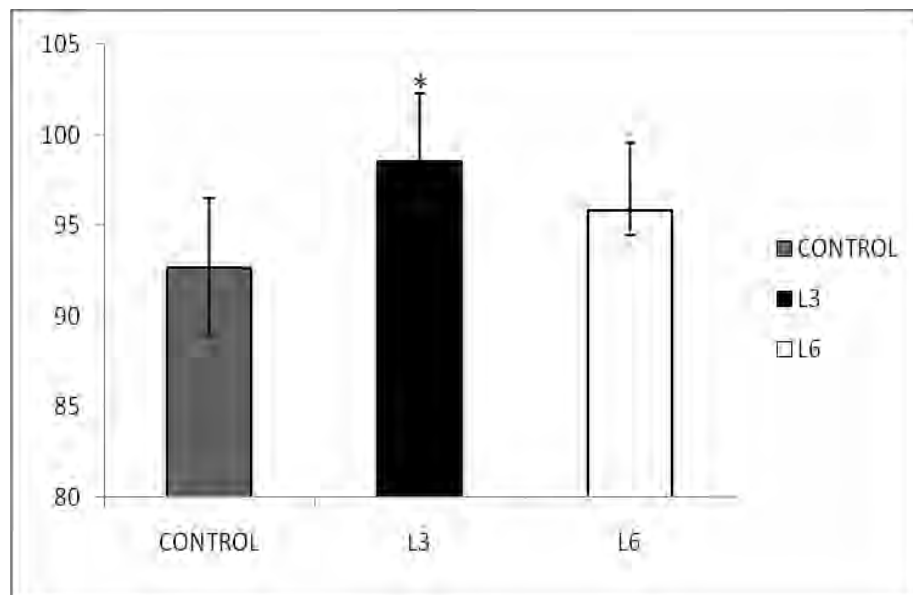


FIGURA 1 - Influence of processing of the control group L3 (Laser $3\text{J}/\text{cm}^2$) and L6 (Laser $6\text{J}/\text{cm}^2$) in the contraction of skin wounds in rats (%) on 10 days (ANOVA, Tukey post-test, $p < 0.05^*$).

Morphometric and Histological Analysis

After 5 days the wounds were open and all wounds showed a moderate inflammatory infiltrate of polymorphonuclear (PMN). There were no significant differences between the histological parameters evaluated in this period. There was an increase in the number of blood vessels of L3 and L6 in the control group (Figure 2).

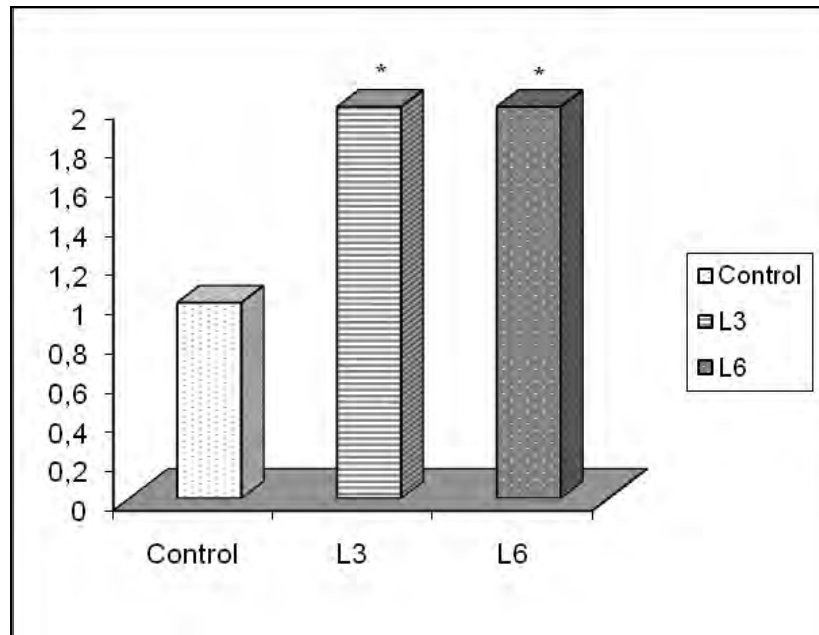


FIGURE 2 - Morphometry of blood vessels. Control, L3 (laser 3J/cm²) and L6 (laser 6J/cm²) on 5 days (Kruskal-Wallis test, Dunn post-test, $p < 0.05^*$).

On the 10 days showed a decrease in the inflammatory process in all experimental groups. There was decreased as the bleeding in L3 compared to control and was also observed a significant decrease in the number of polymorphonuclear cells (Table 1). As for the content of collagen, we observed a significant increase in L3 and L6 in the control group, both in the histological analysis (Figure 3) and morphometry in picrossírius staining. This same result was observed at 15 days between groups L3 and L6 compared to control (Figure 4)

Table 1 - Median of histologic 10 days after surgery groups Control, L3 (Laser 3J/cm²) and L6 (Laser 6J/cm²)

Histological Variables	Controle	L3	L6	Index of Significance
Fibrin	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
Hyperemia	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	0,26
Hemorrhage	1,0 ^a	0 ^b	1,0 ^a	0,007
Inflammatory Infiltrate (PMN)	3,0 ^a	1,0 ^b	1,0 ^b	0,045
Colágeno	1,0 ^a	2,0 ^b	2,0 ^b	0,0003
Vascular proliferation	3,0 ^a	2,5 ^a	2,0 ^a	0,67

Different letters difference.

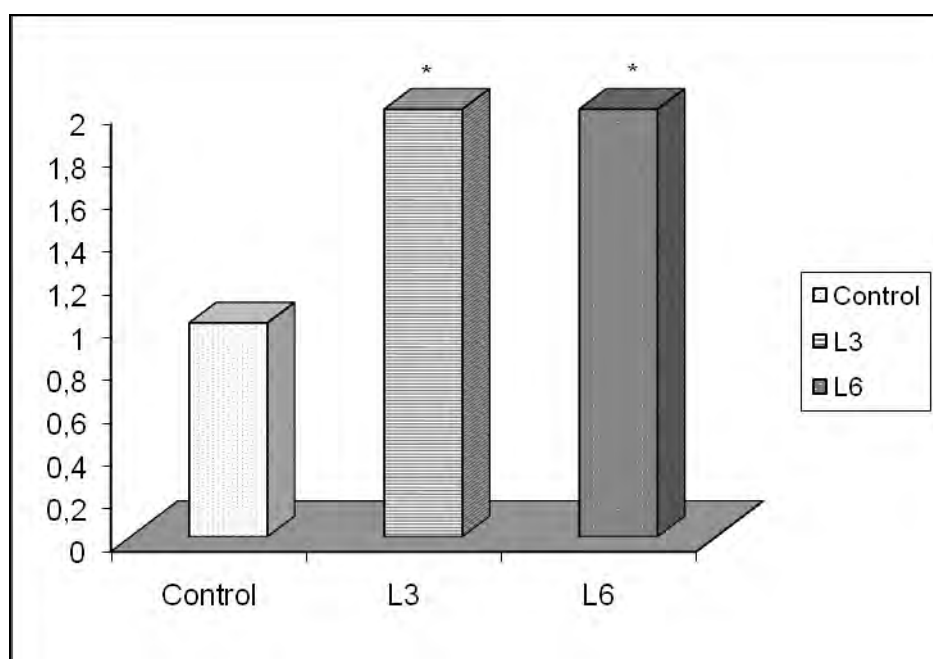


Figure 3 - Median collagen content of 10 days of the groups L3 (Laser 3J/cm²) and L6 (Laser 6J/cm²) compared to control (Kruskal-Wallis test, Dunn post-test, p <0.05*).

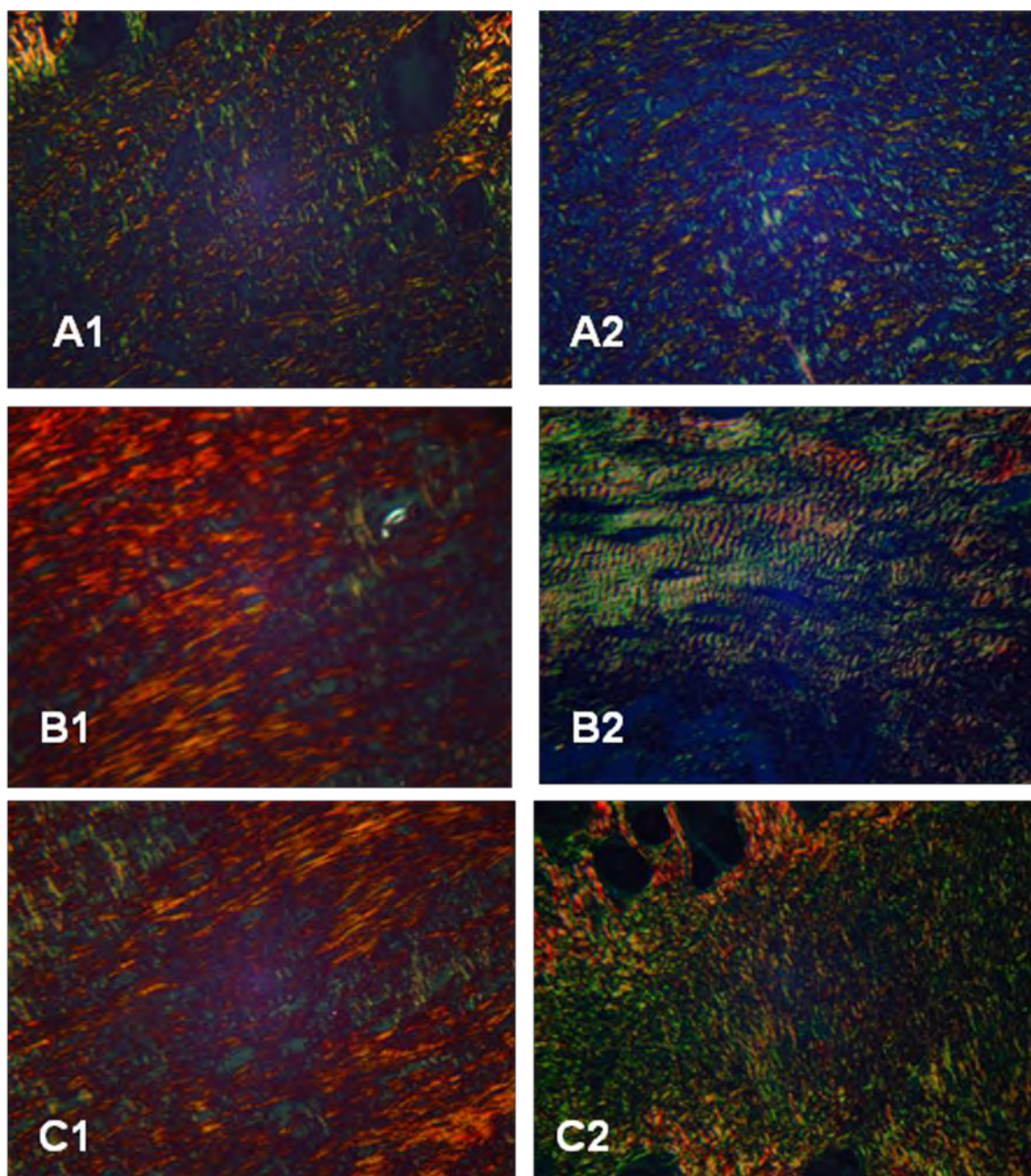


Figure 4 - Photomicrograph of skin wound in rats on 10 days (A1, B1, C1) and 15 days (A2, B2 and C2) after surgery, showing collagen. Control (A), L3 (B) and L6 (C) respectively. Picrossírius. 200x.

Discussion

The increase in the contraction of wound edges skin on 10 days in groups submitted AlGaInP laser indicated positive effect on the healing process, the energy density of $3\text{J}/\text{cm}^2$. Similar results were found in two studies conducted in rats and rabbits using the same energy density^{2,11}. Thus, the laser energy density proposal spurred the closure of skin wounds induced in a shorter period of time.

Showed an increase in the number of blood vessels 5 days in those irradiated by laser. This finding confirms the results of the work of Walker *et al.*¹² showed that the AlGaInP laser acted positively in neoformation of vessels, especially in the initial formation of granulation tissue. It is believed that the cells of the healing process respond to lasers that operate in the red spectral range, especially in stimulating angiogenesis^{3, 13}.

Thus, the angiogenesis observed activity is directly related to the laser. There was a decrease in the number of polymorphonuclear and hemorrhage on 10 days in groups treated with laser. In one study, it was observed that the low intensity laser increased the number and activity of polymorphonuclear cells on bacteria and promotes greater phagocytosis of tissue debris. It was suggested that photomodulation corresponded to an initial increase in the number of inflammatory cells, quickly removing excess soil and subsequently reducing the number of these cells, stimulating production of growth factors for phases seguintes¹⁴. The effects shown in this work as to hemorrhage and polymorphonuclear possibly occurred due to a positive effect on the phase of inflammation, the initial phase of healing, as evidenced in other papers^{4,15}.

The proliferative phase precedes the mature scar tissue, having its beginning around 3, 4 and 14 days after surgery, peaking máximo². The third and final phase of the healing process is known as remodeling or repair, is characterized by replacement of the extracellular matrix. In proportion as the scar tissue matures collagen (mature) and gradually increases (immature) is being absorvido³. Studies have compared several staining methods for analysis of collagen and concluded that the dye picrossírius is the most selective, easy to perform and interpret, being specific to the study of tissue collagen, because the amount of co rant adhered is proportional to the amount of this protein, allowing its use for measuring the same¹⁶.

There are indications that the laser stimulates the transformation of fibroblasts in early miofibroblastos¹⁷. The mechanism by which laser photostimulation facilitates collagen production in wound healing may involve a variety of mechanisms fotoestimulantes. Araújo *et al.*³ in a similar study in wounds, noted that the irradiated dermis contained high numbers of fibroblasts, and these, we found a larger sample of collagen vesicles in their cytoplasm and endoplasmic reticulum are well developed. Byrnes *et al.*¹⁸ studied found that the healing of animals was faster when irradiated (HeNe 632nm 16mW - 4J/cm²) and there was an increased production to

fibroblast growth factor (FGF) in wounds of irradiated animals. Reddy¹⁹, which examined the effect of Ga-As laser radiation in wounds in diabetic rats promoted a 14% increase in collagen deposition. In our study, we observed an increase in collagen production in irradiated animal. Our results are similar to other studies^{20,21} where the laser therapy promoted the increase of collagen fibers.

Conclusion

The diode laser of low intensity Gallium-Aluminum-Phosphorus-Indio (AlGaInP) of energy densities and 3J/cm² 6J/cm² had a positive effect on the healing of skin wounds induced in rats. Was able to stimulate angiogenesis in the early stages of the process, reduced the inflammatory response due to the decrease of polymorphonuclear cells and hemorrhage, and stimulate collagen production.

References

1. Krishnan P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2006; 17(1): 21-27.
2. Rocha Junior AM, Andrade LCF, Oliveira RG, Aarestrup FM, Farias RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a Laser de Baixa Intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(2): 150-6.
3. Araújo CEN, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TMT. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne lasertreated wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2007(1) 86:87-96.
4. Marcon K, Sanfelice AE. Efeitos do Laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. *Rev Fisio da FURB*. 2005; 1(1): 6-8.
5. Parente LML, Silva MSB, Brito LAB, Lino-Júnior RS, Paula JR, Trevenzol LMF, Zatta DT, Paulo NM. Efeito Cicatrizante e Atividade Antibacteriana da *Calendula Officinalis* L. Cultivada No Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med*. 2009;11(4): 383-391.
6. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG, Manfron MP. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev Facul Zootecnia, Veterinária Agronomia*. 2000; 7 (1): 61-5.

7. López LNA, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985; 33(1): 737-43.
8. Biondo-Simões MIP, Alcantra EM, Dallagnol JC. Cicatrização de feridas: estudos comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. *Rev Col Brasil Cir*. 2006; 33 (2):74-8.
9. Ribattil D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo membrane as model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Current. Pharm. Biotechnol*. 2000; (1):73-82.
10. Prado FA, Ambinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balducci I. Defeitos ósseos em tibias de ratos: padronização do modelo experimental. *Rev. Odontol.USP* 2006; (1) 18:7-13.
11. Gul NY, Topal A, Cangul T, Yanik K. Effect of TCC and laser on wound healing. *Veterinary Dermatology*. 2007; 19 (1): 7-14.
12. Walker RMD, Rumpf S, Baxter D, Hirst DG, Lowe AS. Effect of Low- Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2000; 26(1) :41- 47.
13. Andrade AG, Lima CF, Albuquerque AKB. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica *Rev Bras Queimaduras*. 2010; 9(1): 21-30.
14. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level Laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17 (4): 307- 313.
15. Hosgood G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *Vet Clin Small Anim Pract* 2006; 36(1):667-85.
16. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes Jr KS, Barham CD, Waddel DL. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22(3):241-7.
17. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; (2) 1056:486-93.
18. Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, Miracco C, Johnson B, Anders JJ. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22(4): 281-90.

19. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003; 33(5):344-51.
20. Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(1): 47-54.
21. Beheregaray, WK, Gianotti GC, Leal JS, Monteiro FM, Simas SM, Elizeire M, Contesini EA. Uso do Laser ALGaInP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2010; 38(3): 237-243.

Acknowledgements

The Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the post - Graduate Health Sciences, Federal University of Goiás.

Conflict of interest: none

Financial source: CAPES

Correspondence

Kelly Cristina Borges Tacon.

kellytaconn@gmail.com

Rua 208 A, N115, Ed. Vila Nova de Gaia Apt°.102, Setor Vila Nova.

Goiânia – Goiás. CEP 74635050.

(062) 81971091