

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDO JOSÉ CAMELLO DE LIMA

PROTÓCOLO PARA USO DO LASER DIODO TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA  
COMBINANDO COMPRIMENTOS DE ONDAS VERMELHAS E INFRAVERMELHAS  
EM FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS WISTAR

MACEIÓ

2016

Fernando José Camello de Lima

**Protocolo para uso do laser diodo terapia de baixa potência combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas em feridas cutâneas experimentais em ratos wistar**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues

Maceió

201

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

L732p Lima, Fernando José Camello de.  
Protocolo para uso do laser diodo terapia de baixa potência combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas em feridas cutâneas experimentais em ratos wistar / Fernando José Camello de Lima. – 2016.  
88 f. : il.

Orientador: Célio Fernando de Sousa Rodrigues.  
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 69-76.

Apêndice: f. 77-87.

Anexos: f. 88

1. Pele. 2. Laser terapia. 3. Semicondutor. 4. Cicatrização de feridas.  
5. Morfologia. 6. Estereologia. I. Título.

CDU: 616-003.9:612.79



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Fernando José Camello de Lima

Protocolo para uso do laser diodo terapia de baixa potência combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas em feridas cutâneas experimentais em ratos Wistar.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 25 de novembro de 2016.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gitaí – (UFAL)

Prof. Dr. Francisco de Assis Costa - (HU/UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite – (UNINASSAU Maceió)

*Dedico todo o meu esforço, materializado nesta Tese, aos meus primeiros educadores, meus pais: José de Oliveira Lima (In memoriam) e Ilza Camello de Lima. Também presto homenagem a minha querida esposa: Christiane Calheiros Farias de Lima e as minhas fontes de motivação, meus filhos: Felipe, Caio e Lívia.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Alagoas, representada pela Magnífica Reitora Professora Dra. Maria Valéria Costa Correia.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, representada pela Diretora Professora Dra. Iracilda Maria de Moura Lima.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, representada pela Coordenadora Professora Dra. Salete Smaniotto.

Ao meu Amigo e Orientador, Professor Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues, que sempre confiou, apoiou e soube pacientemente me ouvir, desde a concepção do Projeto de Pesquisa até o presente momento, sendo para mim uma honra ter em meu Currículo o registro de seu nome.

Aos meus familiares, que de forma direta ou indireta puderam doar um pouco de seu tempo e atenção para oferecer suporte, principalmente a minha Mãe, Ilza, minha esposa, Christiane, minha sogra, Arlene, e meu sogro, Sérgio, que, dentre outras coisas, deram atenção aos meus filhos, quando, em algum momento, eu não pude estar presente.

Aos meus filhos, fonte de motivação e aprendizado contínuos, que apesar da pouca idade, e das condições particulares de cada um, soberam compreender, cada um ao seu modo, a importância desta conquista na vida de nossa família, principalmente pelo exemplo, que tento deixar como legado, de que o esforço para a obtenção do conhecimento, aliados a preceitos éticos, nos permitem crescer, conquistar espaços, sem derrubar ninguém. E não há nada, que eu possa escrever aqui, que consiga demonstrar o peso de minha gratidão por isto. Amo vocês!

Aos meus amigos de fora da academia universitária, que souberam entender o meu afastamento deles, pois todos reconheceram o valor e a complexidade do momento.

Aos meus colegas de trabalho, em especial, aos professores e funcionários do Setor de Anatomia Humana do ICBS-UFAL, que durante décadas me proporcionaram apoio nas atividades acadêmicas, inclusive durante todo o período de Doutorado.

Aos meus Colegas do Grupo científico de Morfologia Aplicada e Saúde, que contribuíram, sempre de forma desinteressada, na melhoria deste trabalho, formando críticas, oferecendo sugestões, nos textos e nas apresentações.

Ao amigo Prof. Dr. Fabiano Timbó Barbosa, sempre pronto a ajudar de forma crítica, porém construtiva, principalmente na Estatística e nas das revisões sistemáticas.

A minha amiga, esposa de meu querido orientador, Amanda Rodrigues, que muito contribuiu com ideias e na formatação desta Tese.

Aos meus alunos, aqui brilhantemente representados na figura amiga e prestativa de Olavo Barbosa de Oliveira Neto, que muito me ajudou nas correções dos textos em Inglês, mas também contribuindo de forma ativa em parte de nossa produção científica.

A todos os professores das disciplinas que cursei durante este Doutorado, aos quais devo gratidão pela dedicação de parte de seu tempo a ensinar, orientar e tirar dúvidas, as quais sempre contribuindo na formação de novos e importantes conceitos científicos.

A toda equipe de funcionários do Centro de Cirurgia Experimental e Biotério da UNCISAL, principalmente ao Marcelo Melo, que muito me ajudou com o manejo dos animais durante todo o período do experimento.

A todos os meus colegas Cirurgiões-dentistas e demais profissionais da Saúde, todos na difícil missão de proporcionar melhor qualidade de vida as pessoas, que esperam de nós, a busca constante pelo conhecimento a ser revertido prol da sociedade.

Por fim, agradeço a Deus por ter me dado força e saúde para cumprir todas as etapas desta Pós-Graduação, propiciando a realização de um sonho: Obtenção do Título de Doutor.

“Grandes almas sempre encontram forte  
oposição de mentes medíocres.”

Albert Einstein

## RESUMO

Há muitos anos o Laser de baixa potência é usado como recurso terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas, baseado no ganho de energia celular, aumento das mitoses e síntese proteica. Dentre estudos publicados no tema, deve-se resaltar os bons resultados apresentados quando são combinados comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas para o reparo feridas em pele. Porém, ainda há uma necessidade de padronizar parâmetros de ajustes para esta terapia com Laser, em especial a fluência, que agrega variáveis como energia, potência, tempo e área de irradiação. A proposta do presente experimento é encontrar, dentro de uma faixa de fluência, a melhor dose que possa antecipar o reparo de feridas cutâneas. Utilizamos 60 ratos divididos de forma randomizada em quatro grupos: Grupo A, sem irradiação e três grupos com intervenção, os quais receberam Laser Diodo Terapia de Baixa Potência combinando dois comprimentos de ondas (660nm e 808nm), usando a mesma potência (100mW), mas diferentes fluências, cujas suas doses foram igualmente divididas para cada comprimento de onda usado, Grupo B ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ ), Grupo C ( $60\text{J}/\text{cm}^2$ ) e Grupo D ( $120\text{J}/\text{cm}^2$ ). Cada grupo foi avaliado com três (3), sete (7) e quinze dias (15). Os animais foram operados para realização de uma ferida dorsal com punch dermatológico nº8, sendo estas exclusivamente tratadas nos grupos intervenção, entretanto todas foram submetidas a avaliações quantitativas da biometria do fechamento da ferida; mensurações e contagem de estruturas histológicas através de análises morfométricas e estereológicas. A intervenção apresentou resultados significantes na área de retração relativa da ferida (Grupo D3: 43,13%,  $p=0,02$ ), na densidade de volume das fibras colágenas (Grupo D15: 53,44%,  $p=0,0001$ ) e na angiogênese através do aumento da densidade de perfil da área dos vasos sanguíneos (Grupo D3:  $0,008/\mu\text{m}^2$  e Grupo C3:  $0,007/\mu\text{m}^2$ ,  $p=0,001$ ) e do aumento do comprimento dos vasos sanguíneos (Grupo D3:  $0.017\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$  e Grupo C3:  $0.016\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ,  $p=0,0007$ ). A fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , usada no Grupo D, neste experimento, mostrou-se como a melhor dose de fluência para acelerar a cicatrização de feridas.

**Palavras-chave:** Pele. Laser terapia. Semicondutor. Cicatrização de feridas. Morfologia. Estereologia.

## ABSTRACT

The low-level laser has been used for many years as a therapeutic resource for skin wound healing, basing on cellular energy uptake and increasing in mitosis and protein synthesis. Among the published studies on the topic, one must highlight the good results presented when red and infrared wavelengths are combined for skin wound healing. However, there is still a need to standardize the setting parameters for this therapy with laser, specially the fluency, which aggregates several outcomes such as energy, power, time and irradiation area. The proposal of the present experiment is to find, within a fluency range, the best dosage that can hasten skin wound repair. We used 60 rats divided, randomly, into four groups: Group A, without irradiation, and three intervention groups which received Low-Level Diode Laser Therapy combining two wavelengths (660nm and 808nm), using the same power (100mW), but with different fluencies, which dosages were equally divided for each wavelength used as follows: Group B (20J/cm<sup>2</sup>), Group C (60J/cm<sup>2</sup>) and Group D (120J/cm<sup>2</sup>). Each group was assessed with three (3), seven (7) and fifteen (15) days. Animals went through surgery in order to make a dorsal wound with the use of a n<sup>o</sup>8 dermatological punch. These wounds were exclusively treated on intervention groups, however, all wounds were quantitatively assessed with biometry of wound closure; measurements and counting of histological structures were also performed for all wounds through morphometric and stereological analysis. Intervention presented significant results for the relative wound area retraction (Group D3: 43,13%, p=0,02), collagen fibers volume density (Group D15: 53,44%, p=0,0001) and angiogenesis with the increasing in blood vessels density area profile (Group D3: 0,008/μm<sup>2</sup> and Group C3: 0,007/μm<sup>2</sup>, p=0,001) and blood vessels length (Group D3: 0.017μm/μm<sup>2</sup> and Group C3: 0.016μm/μm<sup>2</sup>, p=0,0007). The fluency of 120J/cm<sup>2</sup>, used on Group D, in this experiment, showed as the best fluency dosage to accelerate the healing of skin wounds.

**Key Words:** Skin. Laser therapy. Semiconductor. Wound healing. Morphology. Stereology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Equação para o cálculo do tamanho da amostra.....	38
Figura 2 –	Confecção da ferida de pele e mensurações biométricas	41
Figura 3 –	Intervenção realizada na ferida de pele com LDTBP.....	42
Figura 4 –	Procedimentos realizados para eutanásia e obtenção do fragmento do tecido para biópsia .....	43
Figura 5 –	Equações para calcular o número de pontos e campos no estudo estereológico.....	44
Figura 6 –	Sequência dos eventos metodológicos da pesquisa.....	46
Figura 7 –	Testes e método de quantificação em estereologia.....	47
Figura 8 –	Evolução do fechamento das feridas de pele ao longo do período em relação a cada grupo do experimento.....	56
Figura 9 –	Imagens histológicas de estruturas superficiais de feridas de pele, observadas ao longo do período, em relação a cada Grupo experimental.....	57
Figura 10 –	Imagens histológicas, com ênfase na derme, de ferida de pele, observadas ao longo do período, em relação a cada Grupo experimental.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Retração relativa da área da ferida.....	49
Gráfico 2 –	Densidade de volume do colágeno.....	50
Gráfico 3 –	Densidade de perfil da área dos vasos sanguíneos.....	51
Gráfico 4 –	Densidade de comprimento dos vasos sanguíneos.....	52
Gráfico 5 –	Densidade de superfície dos vasos sanguíneos.....	52
Gráfico 6 –	Exames hematológicos de hemograma e bioquímica....	84
(a-v)		
Gráfico 7 –	Resultados do hemograma.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ajustes dos parâmetros do LDTBP usados nos grupos estudados.....	40
Tabela 2 – Equações biométricas e estereológicas utilizadas.....	44
Tabela 3 – Área de retração relativa da ferida (%).....	78
Tabela 4 – Densidade de volume do colágeno (%).....	78
Tabela 5 – Densidade de perfil da área dos vasos sanguíneos ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	78
Tabela 6 – Densidade de comprimento dos vasos sanguíneos ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ )....	78
Tabela 7 – Densidade de superfície dos vasos sanguíneos ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ).....	79
Tabela 8 – Valores absolutos da retração da área da ferida ( $\text{mm}^2$ ).....	79
Tabela 9 – Volume de retração da ferida ( $\text{mm}^3$ ).....	79
Tabela 10 – Taxa diária de fechamento do volume da ferida ( $\text{mm}^3$ ).....	79
Tabela 11 – Volume relativo da retração da ferida (%).....	79
Tabela 12 – Taxa diária de fechamento da área da ferida ( $\text{mm}^2$ ).....	80
Tabela 13 – Espessura da porção celular do epitélio ( $\mu\text{m}$ ).....	80
Tabela 14 – Espessura da porção aderida da queratina ( $\mu\text{m}$ ).....	80
Tabela 15 – Densidade de volume do epitélio (%).....	80
Tabela 16 – Densidade de volume do fibroblasto (%).....	80
Tabela 17 – Densidade de volume dos vasos sanguíneos (%).....	81
Tabela 18 – Densidade de volume dos leucócitos (%).....	81
Tabela 19 – Densidade de perfil da área do fibroblasto ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	81
Tabela 20 – Densidade de perfil da área do leucócito ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	81
Tabela 21 – Densidade de volume do folículo piloso (%).....	81
Tabela 22 – Densidade de volume do músculo eretor do pelo (%).....	82
Tabela 23 – Densidade de volume da glândula sebácea (%).....	82
Tabela 24 – Densidade do perfil da área do folículo piloso ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	82
Tabela 25 – Densidade do perfil da área do músculo eretor do pelo ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	82
Tabela 26 – Densidade do perfil da área da glândula sebácea ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	82
Tabela 27 – Densidade de superfície do folículo piloso ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ).....	82
Tabela 28 – Densidade de superfície do músculo eretor do pelo	

	$(\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3)$ .....	83
Tabela 29 –	Densidade de comprimento do folículo piloso ( $1/\mu\text{m}^2$ ).....	83
Tabela 30 –	Densidade de comprimento do músculo eretor do pelo ( $1/\mu\text{m}^2$ )	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
40x	Aumento de quarenta vezes
AlGaInP	Gálio Alumínio Índio Fosfito
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância)
ARRIVE	Animals in Research: Reporting in Vivo Experiments (Animais em pesquisa: relatando experimentos in vivo)
At	Área total do sistema teste
ATP	Adenosina Trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
FL	Flórida
$\text{g/mm}^2$	Gramas por milímetro quadrado
Ga AlAs	Gálio Alumínio Arsênico
GaAs	Arseneto de Gálio
Hz	Hertz
I	Total de estruturas fazendo interseção nos arcos cicloides
InGaAs	Índio Gálio Arsênico
InP	Índio Fosfito
J	Joules
K	Potássio
L	Comprimento linear de um arco cicloide
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Luz amplificada pela estimulação energética de radiação)
LDTBP	Laser diodo terapia de baixa potência
Lv	Densidade de comprimento
$\text{mL/Kg}$	Mililitros por quilograma
Mm	Milímetro
$\text{mm}^2$	Milímetro quadrado
mW	MiliWatts

Na	Sódio
Nm	Nanômetro
N	Número
P	Significância
PMN	Polimorfo nuclear
Pp	Pontos tocados pela estrutura no sistema teste
Pt	Total de pontos do sistema teste
Qa	Densidade de perfil da área
Sv	Densidade de superfície
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
Vv	Densidade de volume
W	Watts

## LISTA DE SÍMBOLOS

=	Não alterada ou igual a antes
~	Parcialmente alterada ou com perda parcial
μ	Micro
Π	Pi (letra Grega)
%	Porcentagem
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Fases do processo inflamatório</b> .....	21
<b>2.2</b>	<b>Reparação da ferida cutânea</b> .....	21
2.2.1	Tecido de granulação .....	23
2.2.2	Reepitelização.....	23
<b>2.3</b>	<b>Laser</b> .....	24
2.3.1	Características do Laser .....	24
2.3.2	Princípios gerais da formação do Laser .....	24
2.3.3	Parâmetros do laser .....	25
2.3.4	Lasers semicondutores .....	26
2.3.5	Mecanismos de ação dos LDTBP nos tecidos .....	27
<b>2.4</b>	<b>Experimentos do LDTBP em feridas de pele</b> .....	29
2.4.1	LDTBP com GaAIs .....	29
2.4.2	LDTBP com AlGaInP .....	32
2.4.3	Comparando e combinando LDTBP .....	33
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	36
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
4.1	Objetivo geral .....	37
4.2	Objetivos específicos .....	37
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	38
5.1	Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa.....	38
5.2	Cálculo do tamanho da amostra .....	38
5.3	Formação dos grupos .....	38
5.4	Parâmetros ajustados no Laser .....	40
5.5	Cirurgia para realização das feridas .....	41
5.6	Biópsia, exames laboratoriais e eutanásia .....	42
5.7	Biometria, morfometria e estereologia .....	43
5.8	Cálculo do número de pontos e campos .....	44
5.9	Variáveis .....	47
5.9.1	Variáveis primárias .....	47

5.9.2	Variáveis secundárias .....	48
<b>5.10</b>	<b>Estatística .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Variáveis analisadas pela biometria.....</b>	<b>49</b>
6.1.1	Retração relativa da área da ferida .....	49
<b>6.2</b>	<b>Variáveis analisadas pela morfometria.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Variáveis analisadas pela estereologia.....</b>	<b>50</b>
6.3.1	Fibras colágenas.....	50
6.3.1.1	Densidade de volume do colágeno.....	50
6.3.2	Vasos sanguíneos.....	51
6.3.2.1	Densidade de perfil da área e densidade de comprimento dos vasos sanguíneos.....	51
6.3.2.2	Densidade de superfície dos vasos sanguíneos.....	52
6.3.3	Fibroblastos.....	53
6.3.4	Leucócitos.....	53
6.3.5	Epitélio.....	53
6.3.6	Folículos pilosos.....	53
6.3.7	Glândulas sebáceas.....	54
6.3.8	Músculos eretores dos pelos.....	54
<b>6.4</b>	<b>Análise macroscópica e histológica das feridas.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE A - Ficha de registro de dados do experimento.....</b>	<b>77</b>
	<b>APÊNDICE B - Tabelas de resultados para as quais a intervenção não teve eficácia confirmada.....</b>	<b>78</b>
	<b>Apêndice C - Gráficos de resultados para variáveis complementares.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A epiderme, formada por camadas de células epiteliais e reforçada externamente pela presença da queratina, funciona como um escudo contra agentes nocivos provenientes do meio externo e ajuda a regular a perda de água do corpo. A derme posiciona-se em um estrato imediatamente profundo à epiderme, formada por tecido conjuntivo, onde são encontradas células como fibroblastos, produtoras de fibras colágenas, contribuindo no preenchimento da matriz extracelular, além de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, desempenhando papel na inervação, nutrição, drenagem desses tecidos e auxiliando na manutenção da temperatura corpórea. Complementando a morfologia cutânea em nível histológico, existem as estruturas anexas da pele: com as glândulas sudoríparas, os folículos pilosos onde o pelo é formado, o músculo eretor do pelo e a glândula sebácea (SOUZA et al, 2009; BEM et al., 2010).

Uma ferida na pele interfere com a homeostase do tecido, afetando a morfologia e a fisiologia local, principalmente as lesões ulceradas, que se caracterizam pela perda de continuidade tissular e exposição de camadas mais profundas, que não têm competência para proteger o corpo de eventuais agentes nocivos externos, alterando o fluxo sanguíneo e o trabalho das glândulas, o controle da hidratação e a regulação da temperatura corpórea local (FONDER et al., 2008).

A fisiopatologia dessas feridas, geradas por trauma local agudo, ocorre através de resposta inflamatória, evoluindo em uma sequência de eventos orquestrados por mediadores químicos visando à reparação do tecido ferido. Entretanto, o processo de cura pode sofrer interferências no seu curso e retardos no seu desfecho, por isso a busca constante de recursos terapêuticos que possam acelerar a reparação das feridas de pele, direcionando-as mais precocemente e sem complicações para um reestabelecimento morfofuncional do tecido (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ZGHEIB; XU; LIECHTY, 2014; MARTIN; NUNAN, 2015).

A luz, proposta como meio terapêutico, proporcionou em 1903 o Prêmio Nobel de Fisiologia para Niels Finsen, que usou luz ultravioleta no Lúpus Vulgar. Albert Einstein, em 1917, postulou as bases teóricas para a manipulação controlada de ondas de luz, em 1933 e 1934 Towners e Weber relataram a amplificação das micro-ondas. Porém, o primeiro artigo com Laser de rubi sintético, com comprimento de onda de 694,3 nm, foi publicado em 1960 por Theodore Maiman, um ano depois, em

1961, Gould publicou as indicações clínicas para o uso terapêutico, já o Laser Hélio – Neon teve a sua iniciação como ferramenta terapêutica em 1962 com comprimento de onda de 632,8 nm e que ainda é usado nos dias atuais (ALMEIDA-LOPES, 2003).

Ainda em 1962 o laboratório de pesquisa da General Eletric apresentou características físicas do Laser que utilizava materiais semicondutores como meios ativos (HALL,1962), denominados de Lasers diodo. Esses semicondutores podem compor Lasers com meios ativos iguais ou diferentes, onde elétrons se deslocam e se recombinam nas áreas de junção entre esses meios, para formar radiação não ionizante quando estimuladas pela eletricidade (CATALANI,1997). Apenas no fim da década de 1990 o uso do Laser de diodo e a possibilidade de trabalhar também com Laser infravermelho em baixa potência foi introduzido (ALMEIDA-LOPES, 2003).

Há muitos anos, o Laser de baixa potência é empregado como um recurso terapêutico para aceleração do reparo de feridas cutâneas (NASCIMENTO et al., 2004), visando o restabelecimento das estruturas locais comprometidas (MEDRADO et al., 2008; RODRIGO et al., 2009), associados ou não a infecções (SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011) e a comorbidades, como o diabetes, que costumam agravar o quadro clínico, dificultando a cura (NOUDEH et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; DADPAY et al., 2012).

O Laser de baixa potência, bioestimulador e emissor de energia não ionizante, mesmo sendo bastante estudado pela ciência, ainda não está totalmente explorado, pois os diferentes tipos de Lasers, as variações nos seus ajustes, as técnicas de uso e as diferentes indicações criam este entendimento. Mesmo havendo bons resultados descritos para o uso do Laser de baixa potência em feridas cutâneas (AL-WATBAN; ZHANG, 1995; MENDEZ et al., 2004; CURY et al., 2009), não existe um protocolo definido para os seus ajustes, sendo isto um desafio à ciência (LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014; LIMA et al., 2016).

Mesmo sem um protocolo formado, há indicativos que a associação de comprimentos de onda vermelha e infravermelha seja mais eficaz que o uso isolado (MENDEZ et al., 2004; GUFFEY; WILBORN, 2006; PINHEIRO et al., 2009; RODRIGO et al., 2009; NOUDEH et al., 2010; SANTOS et al., 2011; CUNHA et al., 2012; LEITE et al, 2014). Quanto à potência, os níveis mais elevados usando o modo contínuo podem apresentar melhores resultados (NASCIMENTO et al., 2004; CARVALHO et al., 2010). Já para a fluência ou densidade de energia, apesar de

muitas doses terem sido testadas (MENDEZ et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004; GUFFEY; WILBORN, 2006; VIEGAS et al., 2007; NUSSBAUM et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; RODRIGO et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; NOUDEH et al., 2010; SANTOS et al., 2011; CUNHA et al., 2012; LEITE et al., 2014), não há consenso definido sobre qual seria a melhor. Estudos têm utilizado doses definidas de acordo com critérios próprios, porém, artigo de revisão que analisou diferentes doses, concluiu que os melhores resultados para Lasers de baixa potência podem ocorrer para fluências no intervalo entre 19 e 130J/cm<sup>2</sup> (AL-WATBAN; ZHANG, 1995).

Os Lasers diodo de baixa potência, que podem emitir comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, assim como trabalhar com diferentes níveis de ajustes de fluência, são capazes de provocar bioestimulação em feridas de pele, auxiliando no processo de reparação (MENDEZ et al., 2004; GÁL et al., 2006; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008, CARVALHO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2011; LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014).

Após pesquisa em banco de dados de artigos científicos, encontrou-se bons resultados para a associação de comprimentos de ondas para o uso do LDTBP, porém, como as doses de fluência se mostraram heterogêneas nas publicações, percebeu-se a necessidade de uma resposta para a seguinte pergunta de pesquisa: qual a melhor dose de fluência para acelerar a cicatrização de feridas de pele em ratos no uso combinado de comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas de Laser Diodo Terapia de Baixa Potência (LDTBP)?

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fases do processo inflamatório

Feridas podem ser causadas por fatores biológicos, químicos, térmico e mecânico. Os traumas gerados em procedimentos cirúrgicos irão provocar nos tecidos afetados, inclusive na pele, fenômenos relevantes para a reparação do tecido ferido, sendo estes fenômenos divididos em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação ou remodelamento (CAMPOS et al, 2007; FONDER et al., 2008; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; MARTIN; NUNAN, 2015):

A fase inflamatória tem início no momento da concepção da lesão, normalmente ocorrendo ruptura de vasos, seguido pela vedação destes por plaquetas, e liberação de mediadores químicos, tais como: histamina, serotonina, leucotoxina, bradicinina, citocinas e prostaglandinas. Isso resulta no aumento do fluxo sanguíneo local e permeabilidade vascular, normalmente alcançando o seu auge por volta das 48 horas de evolução.

Na fase proliferativa, iniciada por volta de uma semana após o trauma, começa um incremento na presença de fibroblastos, angiogênese, e início da cobertura epitelial, mas essa fase melhor se caracteriza pela formação do tecido de granulação, composto pelos fibroblastos em proliferação, por vasos sanguíneos em formação, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno tipo III, fibronectina e ácido hialurônico;

Na fase de remodelamento, antes da segunda semana após o trauma, fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, produzindo uma tensão nas margens das feridas em prol do seu fechamento, ocorre gradual substituição das fibras colágenas tipo III por fibras colágenas tipo I, mais resistentes e dispostas de forma mais ordenada, culminado com o reparo do tecido lesionado.

### 2.2 Reparação da ferida cutânea

Como já dito anteriormente, a evolução fisiológica esperada de uma ferida, após reação inflamatória, deve ser a reparação do tecido, que a depender da

extensão e profundidade da lesão pode vir a ser uma regeneração ou cicatrização, cada uma com características próprias (KUMAR et al., 2010, MARTIN; NUNAN, 2015).

A regeneração ocorre em feridas de menor extensão e que atingiu níveis mais superficiais da pele, proporcionando condições para que o tecido retome morfológica e fisiologicamente as mesmas condições que o tecido possuía antes de sofrer lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A cicatrização ocorre em feridas de maior extensão e que tenha atingido extratos mais profundos da pele, nesse caso, o tecido que substituirá o antigo perdido costuma ser mais fibroso, às vezes com revestimento epitelial mais delgado e com menor força de tensão. Por vezes, a exacerbada síntese de fibras colágenas pode levar a formações de queloides (RUIZ et al., 2005; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; MARTIN; NUNAN, 2015).

O nível de comprometimento do tecido portador de uma ferida pode ser classificado em quatro estágios: estágio I, comprometimento apenas da epiderme, sem perda tecidual; estágios II, comprometimento da epiderme associada ou não à derme, ocorrendo perda tecidual; estágio III, comprometimento total da pele associada à necrose da hipoderme e estágio IV, extenso envolvimento da pele, hipoderme e com lesão muscular ou até óssea (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A depender do formato das feridas, e de como sejam manipuladas pelo operador, elas podem ter o seu fechamento por cicatrização de primeira ou segunda intenção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008):

Cicatrização por primeira intenção ocorre quando as margens das feridas estão próximas, preferencialmente lineares, com a mínima perda tecidual, sem infecção, edema insignificante, nem visualizável tecido de granulação. Sendo esta situação bem exemplificada em clássicas incisões cirúrgicas suturadas.

Cicatrização por segunda intenção caracteriza-se pela significativa perda de tecido, onde as margens distantes e com as suas aproximações inviáveis, com ou sem infecção e edema. O fechamento dessas feridas ocorre através da ação contraída de miofibroblastos e recobrimento epitelial.

### 2.2.1 Tecido de granulação

Na fase proliferativa do processo de reparação do tecido afetado é formado o tecido de granulação, como dito anteriormente, composto pela presença de fibroblastos, vasos sanguíneos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno tipo III, fibronectina e ácido hialurônico, mas também por fibroblastos, alguns neutrófilos, linfócitos e nervos, com o objetivo de preencher a ferida temporariamente, dando-a suporte físico e nutricional para possibilitar o seguimento do processo reparador, como o recobrimento epitelial, viabilizando o início de uma gradual substituição do tecido de granulação por um tecido conjuntivo mais fibroso e resistente (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CAMPOS et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; KUMAR et al., 2010; TACON et al., 2011; LEITE et al., 2014; LEITE et al., 2015; MARTIN; NUNAN, 2015).

O tecido de granulação, depois de cumprido o seu papel, passa por uma transformação onde as fibras colágenas tipo III são degradadas por collagenases (metaloproteínas ricas em zinco) sintetizadas e liberadas por fibroblastos, gerando espaços na matriz extracelular para a síntese e excreção de fibras colágenas tipo I, mais resistentes que as do tipo III. Também são produzidas elastinas e proteoglicanas, nesse momento fibroblastos diferenciados, por serem ricos em actinas, os miofibroblastos, atuam na aproximação das margens das feridas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; PINHEIRO et al., 2005; KUMAR et al., 2010; MARTIN; NUNAN, 2015).

### 2.2.2 Reepitelização

Quando o tecido de granulação é estabelecido, preenchendo estratos subjacentes a camada epitelial, geram-se estímulos em células epiteliais que se encontram às margens das feridas, primeiro com a formação da lâmina basal por fibroblastos e novos queratinócitos, em sequência é formado a camada basal, com elevado potencial mitótico, viabilizando a formação das demais camadas do epitélio (BALBINO; PEREIRA, CURI, 2005; KUMAR et al., 2010; MARTIN; NUNAN, 2015).

## 2.3 Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

### 2.3.1 Características do Laser

A luz liberada por aparelhos de Laser é capaz de ser absorvida, refletida ou transmitida podendo ou não sofrer espalhamento nesse processo, porém destaca-se por ter em seus feixes de luz características especiais, como: unidirecionalidade, pois os feixes de luz se propagam em uma única trajetória, portanto paralelos entre si; coerência, porque os picos e vales das ondas emitidas por esta luz são coincidentes na: direção, sentido, amplitude, comprimento e fase; e monocromaticidade, pelo fato do feixe de luz ser emitido com comprimentos de ondas único, proporcionando uma cor pura (ALMEIDA-LOPES, 2003; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008).

Assim como toda luz, os Lasers apresentam ondas eletromagnéticas, emitindo radiação não ionizante, classificadas de acordo com a percepção dos olhos humanos em visíveis, variando em diferentes faixas de cores, assim como no arco-íris, e invisíveis como o infravermelho. Os comprimentos de ondas são medidos pela distância entre dois picos consecutivos desta emissão de luz, usando como unidade de medida o nanômetro (nm), equivalente cada unidade a  $10^{-9}$  metro. Os comprimentos de ondas para luz visível ficam compreendidos entre 400 e 780nm, abaixo disso ficam as radiações ultravioletas e acima as infravermelhas, não percebidas pelo olho humano (BRANDALIZE; PHILIPS, 2016; SILFVAST, 2004; ALMEIDA-LOPES, 2003).

### 2.3.2 Princípios gerais da formação do Laser

O princípio básico para a produção de qualquer tipo de Laser consiste em que um meio ativo (substâncias sólidas, gasosas, líquidas, associação destas e os semicondutores), situado numa caixa de ressonância espelhada, possibilite que a luz produzida assumam uma mesma direção. Quando este meio ativo é excitado por uma fonte de energia externa, fazendo com que o torne um amplificador de radiação, propicia que elétrons absorvam energia e saltem para uma camada mais

externa do átomo, com maior nível de energia (estado metaestável), para em seguida retornar a sua camada original (decaimento), com a liberação de energia concentrada denominada de fóton, que por sua vez induz nos demais átomos a este mesmo decaimento de elétrons que também se encontravam em estado metaestável (SILFVAST, 2004; DAMANTE, 2007).

### 2.3.3 Parâmetros do Laser

Os Lasers podem ser identificados de acordo com alguns parâmetros físicos como (SILFVAST, 2004; BRANDALIZE; PHILIPS 2016; LIMA et al., 2016):

Comprimento de onda ( $\lambda$ ), relacionado com o meio ativo que irá produzir a luz, determinando, por exemplo, se essa luz será vermelha ou infravermelha, expressa em nanômetros (nm) na medida entre dois picos ou dois vales de ondas repetidas sucessivamente;

Densidade de energia ou fluência está diretamente proporcional à energia emitida e inversamente proporcional a área de saída do Laser (*Spot size*), representada pela unidade de medida ( $J/cm^2$ ), e comumente denominada como a dose de tratamento, pelo fato de também está diretamente relacionado com os valores ajustados na potência e no tempo de irradiação;

Energia emitida está diretamente proporcional à potência (Watts) e ao tempo de irradiação (segundos), usando como unidade de medida o Joule (J);

Potência corresponde a energia transmitida durante um intervalo de tempo de irradiação, geralmente medida em miliWatts (mW) para Lasers de baixa potência, usados como bioestimuladores, e em Watts (W) para Lasers de alta potência, sendo assim classificados quando acima de 0,5W, comumente usados em procedimentos cirúrgicos, apresentando potencial de ablação do conteúdo celular, incisão de tecidos e termocauterização;

Densidade de potência óptica ou intensidade está diretamente proporcional à potência emitida pelo aparelho e inversamente proporcional a área de saída do Laser ( $mW/cm^2$  ou  $W/cm^2$ ), pois regula a quantidade de energia entregue aos tecidos;

Modo de funcionamento do Laser que pode ocorrer com a emissão de luz contínua, sem o desligamento até o fim da aplicação, denominado modo contínuo ou

quando a emissão de luz se faz de forma intermitente, denominado de modo pulsátil ou chaveada, podendo esta intermitência variar em diferentes níveis de frequências mensuradas em Hertz (Hz);

Técnica de aplicação ainda pode variar em pontual ou varredura, sendo pontual quando o emissor é usado durante a aplicação de forma estática, concentrando a dose terapêutica em um mesmo ponto, e em varredura quando se realiza movimentos pendulares com o emissor, ampliando a área de aplicação, porém reduzindo a dosagem terapêutica em um mesmo ponto, ainda quanto à técnica pontual, pode-se por o emissor mantendo contato com o tecido ou apenas aproximado, já para a técnica de varredura, recomenda-se apenas o uso aproximado evitando traumatismos nos tecidos tratados.

#### 2.3.4 Lasers semicondutores

Os Lasers semicondutores produzem luz de forma similar ao diodo, sendo a única diferença que os semicondutores emitem luz quando estimulado pela eletricidade e os diodo emitem de forma espontânea, entretanto por serem semelhantes faz o Laser semicondutor receber a denominação de Laser diodo. Essa tecnologia possibilita a fabricação de aparelhos eficazes, menores e de fácil manipulação. Eles funcionam usando dois ou três componentes semicondutores com polos positivos (Zona P) e negativos (Zona N), por onde a radiação é emitida através das laterais da junção entre esses componentes, sendo essas laterais bem polidas e perpendiculares à saída do feixe de luz, servindo como espelhos da caixa de ressonância do Laser, que assim será produzido após a passagem de uma alta corrente elétrica (ALMEIDA-LOPES, 2003, SILFVAST, 2004, DAMANTE, 2007).

As zonas que compõem os Lasers semicondutores podem apresentar uma junção simples (junção P-N), denominada de homojunção, com alta concentração de impurezas, sendo o mesmo material para as duas zonas, como exemplo, os Lasers que usam meios ativos de arseneto de gálio (GaAs) ou índio fosfito (InP); quando os materiais são diferentes nas duas zonas denomina-se heterojunção (junção P-P-N), sendo esta a forma de junção mais comercializada pela vantagem de confinarem a zona ativa do Laser numa região muito pequena, por exemplo: arseneto de

gálio (GaAs) e arseneto de gálio e alumínio (AlGaAs) (DAMANTE et al., 2004a; DAMANTE et al., 2004b; SILFVAST, 2004).

Neste caso, quando ocorre uma tensão elétrica, o espaço desta junção se amplia, criando uma fenda, e os elétrons se deslocam da zona N (zona de valência) para a zona P, para depois se recombinarem, liberando energia e formando radiação luminosa (ALMEIDA-LOPES, 2003).

Os Lasers semicondutores geralmente utilizam dois tipos de materiais (tipo III-IV) que se caracterizam pelo espectro de luz vermelha e/ou infravermelha, são eles: arseneto de gálio (AsGa) e índio fosfite (InP). O AsGa opera na faixa de comprimentos de ondas entre 635 nm e 870 nm, o AlGaInP trabalha na faixa entre 635 nm e 780 nm, AlGaAs entre 780 nm e 830 nm e o InGaAs emitindo comprimento de onda de 940 nm (SILFVAST, 2004; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008; LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014).

Na área da saúde, os Lasers de baixa intensidade inicialmente já eram utilizados visando o fechamento de feridas ulceradas, depois, com um melhor conhecimento dos seus mecanismos de ação nos tecidos, e o avanço dos experimentos científicos, foram constatados efeitos positivos em outras terapias também, como por exemplo: remoção de pigmentos, alívio da dor, recuperação de sensibilidades perdidas (parestesia) e contribuindo no tratamento de infecções. Por outro lado não está indicado o uso dos Lasers de baixa potência em neoplasias, pois irá estimular a proliferação de células tumorais nestas lesões (SROKA et al, 1999; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008; OLIVEIRA et al., 2015; ARDUINO et al., 2016).

### 2.3.5 Mecanismos de ação dos LDTBP nos tecidos

Os mecanismos de ação dos Lasers de baixa potência podem variar, conforme os comprimentos de ondas emitidos. De acordo com (WONG-RILEY et al., 2005) radiações emitidas com luz vermelha e infravermelha estimulam cromóforos fotossensíveis situados na membrana interna das mitocôndrias, enzimas denominadas de citocromos C oxidases (WU et al., 2004; WONG-RILEY et al., 2005)

elevando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) através da fosforilação da adenosina difosfato (KARU, 1988; BOLOGNANI, 1993; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008), levado ao citoplasma a fim de fornecer energia ao metabolismo celular; a luz infravermelha (SMITH et al., 1991) excita a membrana celular, abrindo a bomba de Na-K, aumentando a entrada de cálcio na célula e propiciando no núcleo um incremento na transcrição do DNA com posterior tradução e síntese proteica, como as de fibras colágenas (MENDEZ et al., 2004; MEDRADO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011; GARCIA et al., 2012; NOVAES et al., 2014), assim como duplicação do DNA e incremento das mitoses celulares (KARU, 1988; BAYAT et al., 2008).

Outro aspecto importante, a favor dos Lasers diodo de baixa potência, é que mesmo administrados em diferentes dosagens de fluência (LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014), não provocam alterações térmicas nas áreas irradiadas, evitando perda da energia obtida pela geração de calor, o que também poderia ser danoso ao tecido (AL-WATBAN; ZHANG, 1995; GRANDINÉTTI et al., 2015).

A bioestimulação gerada pelos Lasers de baixa potência pode incrementar o número de fibroblastos (ALMEIDA-LOPES, 2001; MENDEZ et al., 2004; GÁL et al., 2006; GÜNGÖRMÜS; AKYOL, 2009; RIBEIRO et al., 2009; RODRIGO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2011; GARCIA et al., 2012; MORAES et al., 2013) e angiogênese (MENDEZ et al., 2004; GÁL et al., 2006; RODRIGO et al., 2009, BAYAT; AZARI; GALMOHAMMADI, 2010; CARVALHO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2011; TACON et al., 2011; GARCIA et al., 2012; MORAES et al., 2013; NOVAES et al., 2014). Esses fenômenos embasam os princípios terapêuticos usados em algumas patologias locomotoras (PIRES et al., 2011), em mucosas (ALMEIDA-LOPES, 2003; MARINHO et al., 2013) e pele (AL-WATBAN; ZHANG, 1995; MENDEZ et al., 2004; GÁL et al., 2006; GONÇALVES et al., 2010; GÜNGÖRMÜS; AKYOL, 2009; BAYAT; AZARI; GALMOHAMMADI, 2010; CARVALHO et al., 2010; SANTOS et al., 2011; LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014).

Quando tecidos são acometidos por processos inflamatórios de diferentes origens: cirúrgicas (MENDEZ et al., 2004; GÁL et al., 2006; RIBEIRO et al., 2009; NOVAES et al., 2014), queimaduras (BAYAT et al., 2008; MORAES et al., 2013), e

infeciosas (SANTOS et al., 2011; PEREIRA et al., 2014), o Laser de baixa potência pode contribuir com uma resposta anti-inflamatória, principalmente na fase inicial, aonde ocorre intenso infiltrado leucocitário (PIRES et al., 2011; MORAES et al., 2013; NOVAES et al., 2014) na proliferação de células do tecido afetado (MENDEZ et al., 2004; RODRIGO et al., 2009) e no remodelamento morfológico da matriz extracelular no tecido conjuntivo (MEDRADO et al., 2008; NOVAES et al., 2014). A bioestimulação com Laser pode auxiliar no reparo de uma ferida, mesmo quando existem fatores agravantes que costumam retardar o fechamento de uma ferida, como o consumo de nicotina (GARCIA et al., 2012) e o diabetes (CARVALHO et al., 2010; NOUDEH et al., 2010; ESMAEELINEJAD et al., 2014).

## **2.4 EXPERIMENTOS DO LDTPB EM FERIDAS DE PELE**

### **2.4.1 LDTPB com AsGaAl**

A síntese e a organização estrutural das fibras colágenas foram analisadas numa amostra com 112 ratos. O Laser foi administrado em dias alternados com 670nm, 9mW e  $1\text{J}/\text{cm}^2$  para cada um dos quatro pontos tratados. Lâminas histológicas, preparadas pela técnica de imunohistoquímica, indicaram que a terapia com Laser diodo (AsGaAl) deixaram miofibroblastos próximos a vasos sanguíneos no 3º, 7º e 10º dias, e nesses mesmos grupos, analisados no 10º, 15º e 20º dias, tiveram fibras colágenas mais espessas com tendência a troca precoce do colágeno III para o I, permitindo fibras melhor ordenadas. Porém, a partir do 30º dia as amostras se tornaram semelhantes em todos os grupos, havendo uma contribuição da terapia até o 20º dia de avaliação dos tecidos irradiados (MEDRADO et al., 2008).

O comportamento de miofibroblastos e células T e B foram estudados na cicatrização de feridas de pele de 24 ratos. O Laser diodo (AsGaAl) foi usado diariamente por sete dias com 660nm, 40mW e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto e em quatro pontos. As feridas foram processadas através da técnica de imunohistoquímica. O Laser de baixa potência contribuiu no oitavo dia com uma intensa formação de tecido de granulação e significativa presença de miofibroblastos nas margens e fundo das feridas, no décimo quarto dia havia menos miofibroblastos, posicionados paralelamente às fibras colágenas. Quanto às células T e B, estiveram menos

presentes nas feridas irradiadas, porém, as células B estiveram mais presentes (RIBEIRO et al., 2009).

Avaliando a capacidade de recobrimento epitelial, e redução do processo inflamatório na cicatrização de feridas de pele causadas por incisão com Laser diodo de alta potência (40W e 50Hz), 18 ratos receberam duas incisões cada, e foram divididos em dois grupos, sendo um controle (incisão à direita), e outro com Laser diodo de baixa potência (AsGaAl), em dias alternados, com 808nm, potência de 100mW, calculada a partir da irradiância de  $0,1\text{W}/\text{cm}^2$  e área de  $1\text{cm}^2$ , e fluência de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  por sessão, para um total de cinco sessões. Escores qualitativos, no décimo dia, mostraram não haver diferenças entre as feridas para o recobrimento epitelial, já o infiltrado inflamatório, mostrou-se crônico, com alguns fibroblastos na ferida controle e difusamente agudo, com presença de tecido de granulação, na ferida irradiada; no vigésimo dia, as feridas irradiadas mostraram melhor recobrimento epitelial e com cicatrização concluída, porém ainda encontrando infiltrado crônico e proliferação de fibroblastos sem diferença para ambas as feridas (GÜNGÖRMÜS; AKYOL, 2009).

O Laser de alta potência foi usado para duas incisões (à direita e à esquerda do dorso) além de uma incisão com lâmina de bisturi (no centro do dorso) na pele de 18 ratos induzidos à diabetes. Com o Laser diodo de baixa potência (AsGaAl) administrando em dias alternados, na incisão produzida com Laser à direita (808nm,  $2\text{J}/\text{cm}^2$ ), potência de 100mW, calculada a partir da irradiância de  $0,1\text{W}/\text{cm}^2$  e área de  $1\text{cm}^2$ , por sessão para um total de cinco sessões até o oitavo dia pós-operatório. No décimo dia, para todas as feridas, o recobrimento epitelial ocorreu em menos da metade da ferida, observou-se inflamação aguda nas amostras não irradiadas pelo Laser de baixa potência e maior presença de fibroblastos nas feridas incisadas com Laser; no vigésimo dia não houve diferença entre os grupos para o recobrimento epitelial e o infiltrado inflamatório. Concluindo-se que os reparos avançaram melhor nas feridas incisadas com Laser, tratadas ou não com bioestimulação (AKYOL; GÜNGÖRMÜS, 2010).

Feridas de pele abertas tratadas com Laser diodo de baixa potência (AsGaAl) foram investigadas em 30 ratos divididos em dois grupos: placebo e o grupo que recebeu irradiação diária com Laser usando 780nm, 9,91mW,  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e modo de aplicação pulsátil, com frequência de 2336Hz e pulso de 0,3 milissegundos. Os dois grupos foram avaliados com 4, 7 e 15 dias. Os espécimes das feridas passaram por

teste biomecânico computadorizado, medindo a sua elasticidade e análise histológica. O grupo intervenção teve elasticidade superior ao placebo no quarto e décimo quinto dias, resistindo ao máximo de estresse mecânico ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ), histologicamente, no grupo intervenção houve menos macrófagos no quarto dia, mais fibroblastos e vasos sanguíneos no sétimo dia e no décimo quinto dia havendo incremento de fibroblastos e aumento do endotélio vascular. Confirmando a contribuição do Laser diodo de baixa na qualidade do processo cicatricial (BAYAT; AZARI; GALMOHAMMADI, 2010).

O Laser diodo de baixa potência (AsGaAl) foi comparado com um óleo cicatrizante em feridas de pele de 24 ratos, divididos em quatro grupos: grupo controle, grupo L30 e L60, que foram tratados diariamente com Laser usando 830nm, 9mW, técnica de varredura, porém variando entre os grupos a fluência de 30 ou  $60\text{J}/\text{cm}^2$  e o grupo que recebeu apenas o óleo cicatrizante. O experimento durou 20 dias, e a cada quatro dias foi removida uma das feridas para análise histológica, identificando fibroblastos e diferenciando colágenos I e III. Presença significativa de fibroblastos foram identificados no quarto dia, para os Grupos irradiados, e no oitavo dia, para o Grupo do óleo cicatrizante, neste período, novos vasos sanguíneos foram visualizados principalmente no grupo L60, porém, no vigésimo dia, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para a presença de fibroblastos e novos vasos sanguíneos. Quanto à maturação do colágeno III para o I, foi mais intenso no grupo L60 no quarto e vigésimo dias, e no grupo L30 no décimo sexto dia (GONÇALVES et al., 2010).

A influência do Laser diodo de baixa potência (AsGaAl) na cicatrização de feridas de pele, em animais que receberam nicotina, foi pesquisado em 115 ratos divididos em quatro grupos: G1, com injeções de solução salina e sem Laser; G2, com solução salina e tratado com Laser; G3, com injeções de nicotina e sem Laser e G4, com nicotina e Laser. Todos tiveram uma ferida dorsal, os animais irradiados (G2 e G4) usaram Laser com 660nm, 30mW e  $5.57\text{J}/\text{cm}^2$  em nove pontos da ferida. Os resultados histológicos indicaram que o Laser pode interferir positivamente na cicatrização de feridas, nos Grupos que receberam nicotina, reduzindo o processo inflamatório, atraindo mais fibroblastos e antecipando o recobrimento epitelial, porém, apenas quando comparando ao Grupo com nicotina e sem Laser (G3), que apresentaram retardando nas diferenciações celulares e no avanço do reparo do tecido cutâneo, entretanto, também ficou demonstrado, o efeito prejudicial da

nicotina, mesmo com o uso do Laser se comparado a um tecido sem a nicotina (GARCIA et al., 2012).

#### 2.4.2 LDTBP com AlGaInP

O Laser diodo (AlGaInP) foi analisado na cicatrização de feridas de pele de 49 ratos divididos em sete grupos que receberam duas incisões paralelas. Apenas as incisões à esquerda do dorso foram irradiadas com Laser utilizando diariamente, com 670nm, 10mW de potência calculado a partir da irradiância de  $25\text{mW}/\text{cm}^2$  e área de  $0,4\text{cm}^2$ , e fluência de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto em três áreas por dia. A partir do primeiro dia, o grupo G1 passou pela eutanásia, no segundo dia o grupo G2 e assim sucessivamente até o sétimo dia o grupo G7. As feridas irradiadas no primeiro dia, não apresentavam epitélio, fibras colágenas nem vasos, contudo houve grande quantidade de leucócitos; no segundo dia, surgimento de epitélio e fibroblastos, mas seguindo com características do primeiro dia; no terceiro dia, início da queratinização, presença de fibras colágenas e vasos sanguíneos, aumento dos fibroblastos, redução dos PMN e manutenção dos macrófagos; no quarto dia, epitélio mais espesso, redução expressiva dos PMN e macrófagos, vasos sanguíneos, fibroblastos dispostos verticalmente e incremento do colágeno; no quinto dia, mostrou fechamento epitelial, maior presença de vasos sanguíneos, fibroblastos, colágenos e menos macrófagos, no sexto dia, os fibroblastos posicionaram-se na vertical, mas com alguns na horizontal, sem diferença para o grupo controle, redução do tecido de granulação e número de vasos sanguíneos, semelhante ao dia anterior, e no sétimo dia, o epitélio completo, sem PMN, fibroblastos dispostos horizontalmente, menos macrófagos, mais colágeno e menos vasos sanguíneos (GÁL et al., 2006).

Feridas de pele foram avaliadas histologicamente e macroscopicamente por meio de imagens para análise dos efeitos do tratamento com Laser diodo (AlGaInP) utilizando 54 ratos divididos em três grupos, avaliados no quinto, décimo e décimo quinto dias. Um Grupo controle, e dois Grupos que receberam diariamente Laser de modo contínuo, técnica de varredura, 660nm, 30mW, mas variando a fluência de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  (Grupo L3) ou  $6\text{J}/\text{cm}^2$  (Grupo L6). Usando planimetria, para quantificação das estruturas, foram encontrados no quinto dia moderado infiltrado de PMN, sendo menor para o grupo L3, no décimo dia, ocorreu significativo incremento de vasos

sanguíneos nos grupos L3 e L6 e no décimo quinto dia, significativo aumento das fibras colágenas nas feridas irradiadas. Macroscopicamente as feridas para os grupos L3 e L6, apresentaram cascas mais espessas no quinto dia, sem hiperemia no décimo dia, mas chegando ao décimo quinto dia com todas as feridas tratadas ou não macroscopicamente cicatrizadas (TACON et al., 2011).

A influência do Laser diodo (AlGaInP) sobre fibras colágenas e macrófagos foi realizada com imunohistoquímica em feridas cutâneas de 30 ratos diabéticos divididos em dois grupos: Grupo controle e Grupo intervenção, recebendo Laser de modo contínuo, técnica de varredura, com 660nm, 100mW e 10J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram avaliados com três, sete e quatorze dias. As feridas irradiadas, ao longo de todo período tiveram maior produção de fibras colágenas e menor presença de macrófagos (CARVALHO et al., 2010).

Foram estudadas queimaduras de pele, com o objetivo de testar o efeito anti-inflamatório do Laser diodo (AlGaInP) em 36 ratos divididos em três grupos avaliados em quatro momentos após a queimadura (3, 7, 14 e 21 dias). O grupo controle recebeu tratamento com sulfadiazine de prata e os dois grupos intervenção foram irradiados, com técnica pontual, de modo contínuo, três vezes por semana, com 660nm, potência 20mW e variando entre os grupos, a dose de fluência por ponto de 3 ou 6J/cm<sup>2</sup> em quatro pontos. As análises demonstraram maior produção de fibras colágenas no sétimo dia e maior recobrimento epitelial no vigésimo primeiro dia para o grupo que recebeu dose de 6J/cm<sup>2</sup>, porém ambas as doses do Laser foram favoráveis à cicatrização das feridas por queimadura (MORAES et al., 2013).

#### 2.4.3 Comparando e combinando LDTBP

O uso isolado e combinado de diferentes comprimentos de ondas de Lasers diodo com potência de 35mW foi testado na cicatrização de feridas de pele variando as doses em quatro pontos por sessão administradas em dias alternados em 60 ratos divididos em sete grupos: grupo I sem Laser; grupo II usando 685nm e 20J/cm<sup>2</sup>; grupo III 830nm e 20J/cm<sup>2</sup>; grupo IV associando 685nm com 10J/cm<sup>2</sup> e 830nm com 10J/cm<sup>2</sup>; grupo V 685nm e 50J/cm<sup>2</sup>; grupo VI 830nm e 50J/cm<sup>2</sup> e grupo VII associando 685nm com 25J/cm<sup>2</sup> e 830nm com 25J/cm<sup>2</sup>. Os momentos avaliados

foram com três, cinco e sete dias após a cirurgia realização de ferida dorsal. No terceiro dia, mostrou menor infiltrado inflamatório dos grupos intervenção e delicada formação de fibras colágenas; no quinto dia, semelhança ao terceiro dia, entretanto, com presença de novos vasos sanguíneos e incremento de fibroblastos, e no sétimo dia, verificou-se intensa vascularização com vasos envolvidos por fibras colágenas, mais fibroblastos, discreto infiltrado mononuclear e ainda sem formação epitelial. O grupo IV, que combinou comprimentos de ondas somando dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentou melhor resultado pela presença de colágenos, menor infiltrado inflamatório e pela formação de vasos sanguíneos, entretanto, bons resultados também ocorreram nos grupos V e VII (MENDEZ et al., 2004).

O feito sistêmico do Laser diodo foi avaliado em feridas de pele diretamente irradiadas em dias alternados, e em feridas afastadas não irradiadas, onde foram analisados parâmetros de cicatrização. Para isto, 36 ratos receberam três feridas dorsais medianas, onde apenas uma foi tratada. A amostra foi dividida em quatro grupos: Grupo I, sem Laser, grupo II, recebendo Laser vermelho ( $\text{GaAlInP} = 670\text{nm}$ ), grupo III, com Laser infravermelho ( $\text{AsGaAl} = 830\text{nm}$ ) e grupo IV combinou os dois comprimentos de ondas, dividindo a dose de fluência e mantendo a potência. Cada grupo foi avaliado com três, cinco e sete dias. Os Grupos intervenção receberam dose de fluência de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  e potência de  $30\text{mW}$ , quando usado luz vermelha e de  $50\text{mW}$  quando infravermelha. O resultado, que exibiu maior avanço nas feridas distantes, ficou mais bem evidenciado no sétimo dia. Porém, o melhor resultado para as feridas irradiadas diretamente ou não irradiadas ocorreu quando os comprimentos de ondas foram combinados na mesma terapia (RODRIGO et al., 2009).

Em uma amostra de 19 ratos, destes nove diabéticos, com o objetivo de avaliar se a combinação de Lasers diodo vermelho ( $\text{GaAlInP} = 670\text{nm}$ ) e infravermelho ( $\text{AsGaAl} = 810\text{nm}$ ) pode acelerar a cicatrização de feridas de pele, foi dividida em quatro grupos: controle diabetes, Laser diabetes, controle não diabetes e Laser não diabetes. As feridas, com  $12\text{mm}$  de diâmetro, foram fotografadas para mensurações no dia da cirurgia e com mais 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 24 dias, sendo a urina coletada ao longo de sete dias. Os grupos que usaram o Laser combinaram as aplicações dos dois comprimentos de ondas nas mesmas regiões com os seguintes ajustes: Laser vermelho com  $500\text{mW}$  e  $10\text{J}/\text{cm}^2$  e o infravermelho com  $250\text{mW}$  e  $1.33\text{J}/\text{cm}^2$ , aplicando a terapia a cada três dias, usando modo pulsátil em três frequências ( $292\text{Hz}$ ,  $584\text{Hz}$  e  $1168\text{Hz}$ ) até o último dia do experimento. As análises

estatísticas não apresentaram diferenças entre os animais diabéticos e não diabéticos, porém constatou-se um aumento no volume de urina de ratos não diabéticos e tratados com Laser, não sendo este efeito esclarecido (NOUDEH et al., 2010).

Diferentes comprimentos de ondas, de Laser diodo de baixa potência, foram testados em feridas de pele contaminadas por *Staphylococcus aureus* em 24 ratos, divididos em quatro grupos: grupo controle; grupo do Laser vermelho utilizando 680nm, 30mW; grupo do Laser infravermelho utilizando 790nm, 40mW, ambos com 5J/cm<sup>2</sup> por ponto em quatro pontos da ferida; e o grupo da associação dos Lasers vermelho e infravermelho, que usou fluência dos demais Grupos, dividida para cada comprimento de onda, quanto a posologia, para todos, a intervenção ocorreu em dias alternados. A terapia durou sete dias, mas cada Grupo foi avaliado com oito e quinze dias. Novos vasos, proliferação de fibroblastos e recobrimento epitelial das feridas, para os dois comprimentos de ondas usados, foram encontrados nos dois dias avaliados, entretanto, quando a associação ocorreu, verificou-se nos dois dias estudados menos infiltrados inflamatório, mais fibras colágenas, que se mostraram maturadas e organizadas paralelas ao plano epitelial. Com isso, foi constatada nas feridas de pele contaminadas, que o seu processo de reparação é acelerado quando associando comprimentos de ondas (SANTOS et al., 2011).

O impacto térmico do Laser diodo de baixa potência foi avaliado com câmaras termográficas, quando associado comprimentos de ondas vermelhas (640 nm) e infravermelhas (875 nm), em frequência pulsátil (250 Hz), com diferentes ajustes de energia para diferentes pigmentações de pele. Foram selecionados 42 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos. Os indivíduos foram randomizados em grupos que receberam diferentes doses de energia: 0 J por 60 segundos, 10J por 76 segundos, 30J por 228 segundos e 50J por 380 segundos, sendo a temperatura avaliada nos últimos cinco segundos de aplicação do Laser e por mais um minuto após a irradiação finalizada. Comparando as diferentes pigmentações de pele, grupos etários e gênero não se constataram significativos aumentos de temperatura na área tratada ( $P>0,05$ ). Por tanto, este estudo indicou que, usando o Laser diodo no modo pulsátil, e associando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, não há aquecimento tecidual da pele, mesmo quando varia a pigmentação da mesma (GRANDINÉTTI et al., 2015).

### 3 HIPÓTESE

Considerando dados de revisões sistemáticas (LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014, LIMA et al., 2016), o uso da menor dose de fluência testada ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ ), combinada com a potência de 100 mW, propicia no período de três dias após a cirurgia a maior aceleração do processo cicatricial da ferida cutânea. Entretanto, não havendo na literatura pesquisada trabalhos com feridas de pele em ratos, usando Laser Diodo de Baixa Potência, associando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas em todos os seus Grupos intervenção, bem como também não sendo encontrada, nesse contexto metodológico, uma avaliação com estereologia. Por isso, não se pode quantificar na hipótese, com base na literatura, qual à medida deste resultado.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Criar um protocolo de dosagem de fluência ( $J/cm^2$ ), ainda não definido, para o uso combinado de comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas nos tratamentos de feridas de pele com Laser Diodo Terapia de Baixa Potência (LDTBP).

### 4.2 Objetivos específicos

a) Determinar em que período de tempo pós-operatório, três, sete ou quinze dias, ocorreu o maior avanço do processo cicatricial das feridas de pele combinando comprimento de ondas vermelhas e infravermelhas no uso do LDTBP;

b) Avaliar, através de técnicas biométricas, o fechamento de feridas de pele com o uso combinado de comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas do LDTBP;

c) Utilizar técnicas morfométricas para mensurar as espessuras dos recobrimentos epiteliais e da queratina dessas feridas durante o processo de reparação;

d) Quantificar através de técnicas estereológicas elementos importantes para a reparação das feridas de pele.

## 5 MATERIAL E MÉTODO

### 5.1 Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas em 18 de dezembro de 2013, identificado pelo protocolo 103-A.

### 5.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra (Figura 1) foi realizado com a fórmula aplicada em estudos estereológicos (Cruz-Oriver; Weibel, 1990),  $P = (0,5)^n$ , determinando que os grupos em cada seguimento de tempo tivessem cinco animais, portanto, considerando os três seguimentos usados no experimento, foram utilizados 15 animais por grupo.

**Figura 1 - Equação para o cálculo do tamanho da amostra.**

$$p = (0,5)^n \dots \text{Logo, se } n=5 \text{ teremos:}$$

$$p = (0,5)^5 \dots p = 0,03 \text{ (} p < 0,05 \text{)}$$

Fonte: AUTOR, 2016.

### 5.3 Formação dos grupos

Este estudo baseou-se em diretrizes de pesquisa com animais para o manejo da amostra utilizando *the ARRIVE guidelines for reporting animal research* (KILKENNY et al., 2012).

A amostra composta por 60 ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, machos, com 60 dias de vida, massa corpórea entre 250 e 300 gramas, clinicamente saudáveis cedidos pelo Centro de Cirurgia Experimental e Biotério da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas.

Os ratos foram randomizados por sorteio em quatro grupos, sendo um não tratado e três tratados com irradiação da associação entre comprimentos de onda do Laser vermelho e infravermelho em quatro pontos da ferida (MENDEZ et al, 2004; MEDRADO et al, 2008; RIBEIRO et al, 2009; SANTOS et al, 2011; MORAES et al, 2013) (Tabela 1), onde cada ponto recebeu metade da dose de fluência com Laser de comprimento de onda vermelha (Ínio Gálio Alumínio Fosfito- InGaAlP com 660nm) e outra metade com Laser de comprimento de onda infravermelho (Arseneto Gálio Alumínio- AsGaAl com 808nm), ficando os grupos, portanto da seguinte forma:

Grupo A - Controle (sem irradiação);

Grupo B – Aplicação de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  de cada comprimento de onda, totalizando  $20\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto irradiado/dia;

Grupo C – Aplicação de  $30\text{J}/\text{cm}^2$  de cada comprimento de onda, totalizando  $60\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto irradiado/dia;

Grupo D – Que recebeu a aplicação de  $60\text{J}/\text{cm}^2$ , totalizando  $120\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto irradiado/dia.

Cada grupo foi avaliado, após o dia da cirurgia, nos períodos de tempo três, sete e quinze dias, para acompanhar a evolução do processo cicatricial (Figura 6). Todos os animais ficaram em gaiolas individuais, com períodos de luz/escuridão de 12 horas cada, alimentando-se com ração específica (Presence® ratos e camundongos– Invivo – Descalvado, SP, Brasil), e água *ad libitum* e durante todo o período do experimento não houve registros de perdas nem exclusões.

#### 5.4 Parâmetros ajustados no LASER

Os parâmetros de ajuste do Laser diodo terapia de baixa potência (LDTBP) mostram variações na dose de fluência, e por consequência do valor constante da potência, o tempo e a energia emitida pelo aparelho Photon Lase III (DMC - Plantation, FL, USA), também sofreram variações entre os grupos, considerando que a dose de fluência é diretamente proporcional a energia, que por sua vez também é diretamente proporcional ao intervalo de tempo de irradiação (Figura 2 e Tabela 1).

**Tabela 1- Ajustes dos parâmetros do LDTBP usados nos grupos estudados.**

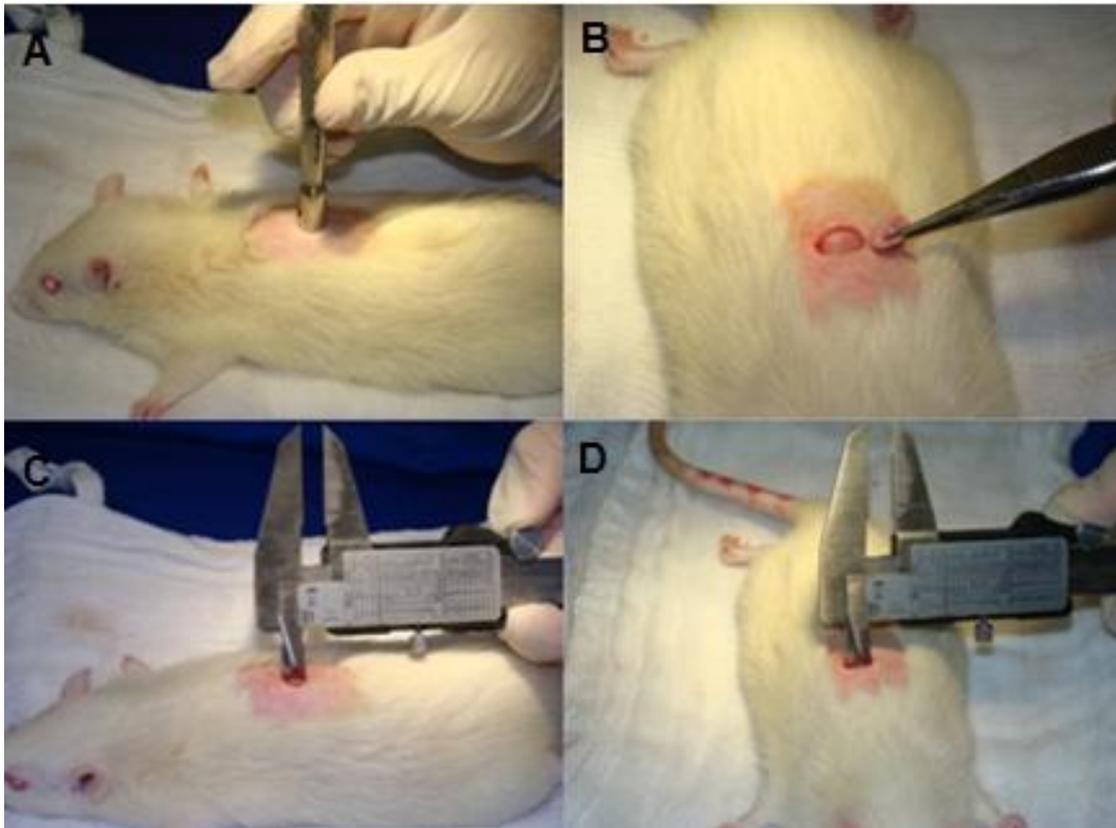
Grupos	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
LDTBP				
Meio ativo	Sem Laser	InGaAIP GaAIAs	InGaAIP GaAIAs	InGaAIP GaAIAs
Comprimento de onda	Sem Laser	660nm 808nm	660nm 808nm	660nm 808nm
Potência	Sem Laser	100Mw	100Mw	100mW
Intensidade	Sem Laser	393,7mW/cm <sup>2</sup>	393,7mW/cm <sup>2</sup>	393,7mW/cm <sup>2</sup>
Energia	Sem Laser	2x 0,2J 0,4J	2x 0,8J 1.6J	2x 1,6J 3.2J
Tempo total	Sem Laser	2x 2 seg 4 seg	2x 8 seg 16 seg	2x 16 seg 32 seg
Modo	Sem Laser	Contínuo	Contínuo	Contínuo
Spot size	Sem Laser	~0,254cm <sup>2</sup>	~0,254cm <sup>2</sup>	~0,254cm <sup>2</sup>
Posologia	Sem Laser	Dias alternados	Dias alternados	Dias Alternados
Técnica	Sem Laser	Pontual	Pontual	Pontual
Local	Sem Laser	(Margens anterior, posterior e laterais da ferida.)		
Fluência	Sem Laser	InGaAIP=10J/cm <sup>2</sup> GaAIAs =10J/cm <sup>2</sup> Total = 20J/cm <sup>2</sup>	InGaAIP=30J/cm <sup>2</sup> GaAIAs= 30J/cm <sup>2</sup> Total = 60J/cm <sup>2</sup>	InGaAIP=60J/cm <sup>2</sup> GaAIAs= 60J/cm <sup>2</sup> Total = 120J/cm <sup>2</sup>

Fonte: AUTOR, 2016.

## 5.5 Cirurgias para as realizações das feridas

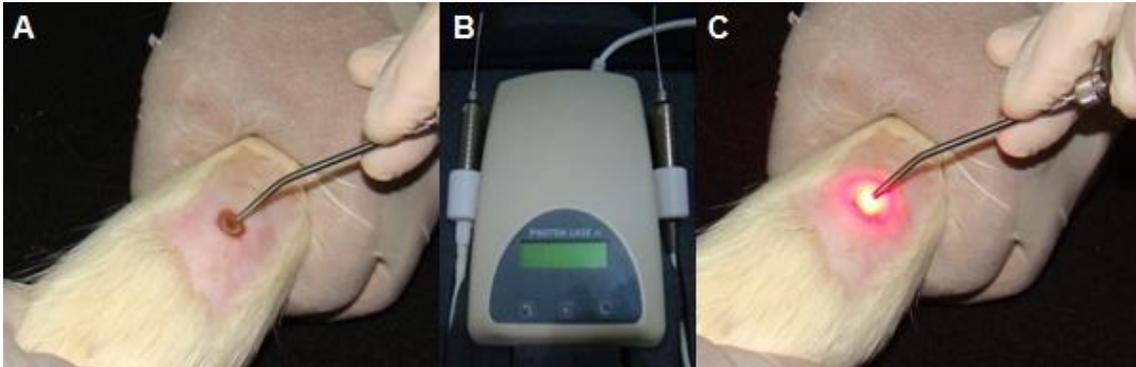
Para a confecção da ferida cutânea dorsal, os animais foram anestesiados com injeções peritoneais de cetamina (1% 0,9mL/Kg) e cloridrato de xilasina (2% 0,1mL/Kg). Após, realizou-se a tricotomia manual, antissepsia com clorexidina 2% e remoção de fragmento de pele com auxílio de um punch dermatológico nº 8 (Rhosse – Ribeirão Preto, SP, Brasil) com profundidade limitada à fáscia muscular, esta ferida foi realizada posteriormente a dobra cutânea dorsal do pescoço. Em seguida procedeu-se a mensuração com paquímetro digital (Titan TIT-C454® - Cidade de Leste, Paraguai) dos eixos ântero-posterior, látero-lateral da ferida e da espessura do fragmento removido (Figura 3) e logo após, deu-se início as terapias com LDTBP.

**Figura 2 - Confecção da ferida de pele e mensurações biométricas.**



Incisão realizada com o Punch dermatológico n.8 (A); fragmento de pele removido após incisão e exposição da ferida (B); mensuração ântero-posterior da ferida para biometrias (C) e mensuração látero-lateral da ferida também para biometrias (D). Fonte: AUTOR, 2016.

**Figura 3- Intervenção realizada na ferida de pele com LDTBP.**



Uso do LDTBP com comprimentos de ondas infravermelhas (A); aparelho de LDTBP utilizado nas intervenções, com ponteira para comprimentos de ondas vermelha e infravermelha (B) e uso do LDTBP com comprimentos de ondas vermelhas (C). Fonte: AUTOR, 2016.

### 5.6 Biópsias, exames laboratoriais e eutanásia

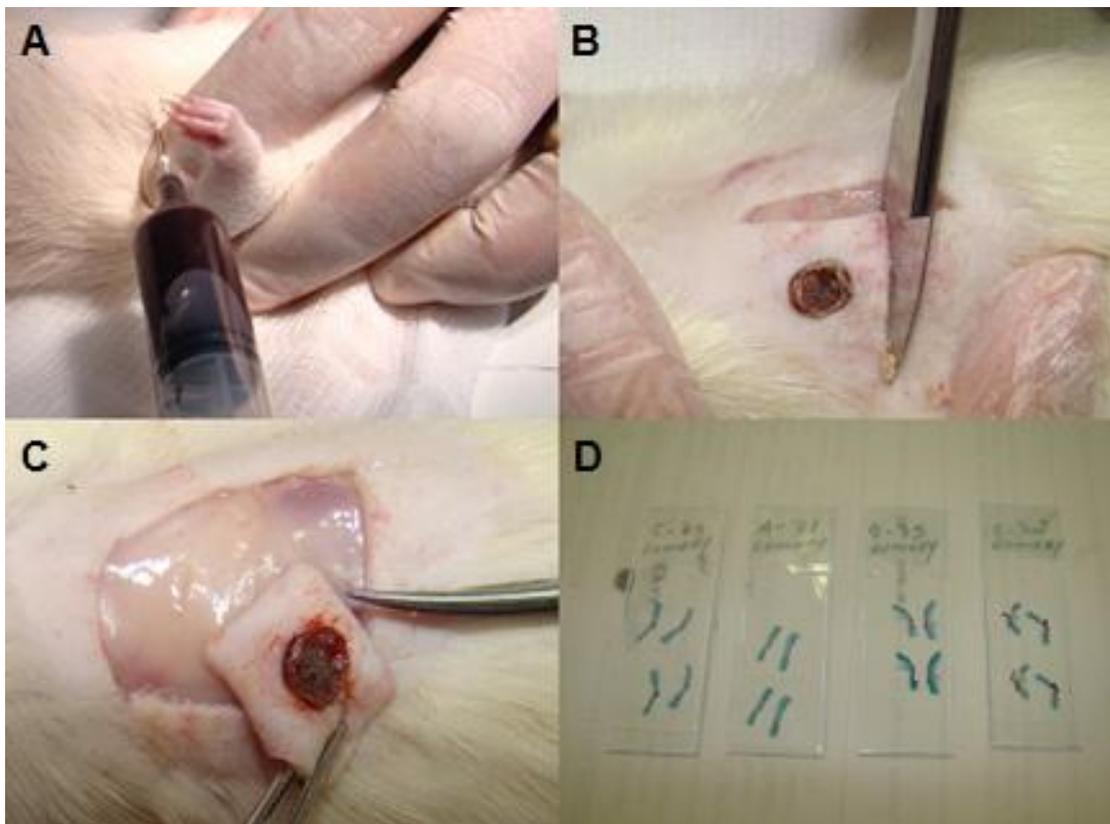
Após os três diferentes períodos da cirurgia (CARVALHO et al., 2010; BAYAT; AZARI; GOLMOHAMMADI, 2010), os animais de cada seguimento (três, sete e quinze dias) foram novamente anestesiados e submetidos às mesmas mensurações biométricas. Com os animais anestesiados, procedeu-se a biópsia de área cutânea com margem de tecido sadio ao redor da ferida, totalizando 225mm<sup>2</sup>. Cada fragmento foi fixado em formaldeído a 10%, processadas para rotina histológica com microscopia de luz e corados com tricrômio de Gomori pigmentando os componentes tissulares da pele, e em especial de verde as fibras colágenas. O sangue cardíaco foi coletado através de punção transtorácica para realização de exames laboratoriais: hemograma e bioquímica (glicemia, creatina, ureia, triglicerídeos e lipidograma). Esta punção sanguínea levou os animais à eutanásia por choque hipovolêmico, ainda sob efeito da anestesia (Figura 4).

Em cada lâmina histológica, foram alocados quatro cortes de 5µm de espessura (retirados especificamente dois à direita e dois à esquerda do tecido biopsiado, sendo 10 cortes descartados previamente a cada par de cortes selecionados). As imagens foram obtidas com um microscópio óptico Olympus BX51® (Miami, FL, USA), no aumento de 40x.

### 5.7 Biometria, morfometria e estereologia

A biometria das feridas foi realizada para medir a área da superfície e o volume das feridas no início e no término do experimento, possibilitando conhecer os valores absolutos e relativos da retração e a taxa diária de fechamento destas. A morfometria serviu para aferir a espessura da queratina e do epitélio; e recursos estereológicos foram aplicados para uma análise quantitativa e tridimensional nas imagens histológicas, medindo a densidade de volume (Vv), densidade de perfil da área (Qa), densidade de superfície (Sv) e a densidade de comprimento (Lv) de estruturas como epitélio e fibras colágenas (avaliadas pela Vv), fibroblastos, infiltrado leucocitário e glândula sebácea (avaliadas pelas Vv, Qa), angiogênese, folículos pilosos e músculo eretor do pelo (avaliadas pelas Vv, Qa, Sv, Lv). As fórmulas utilizadas nas biometrias e estereologia estão na tabela 2.

**Figura 4 - Procedimentos realizados para eutanásia e obtenção do fragmento do tecido para biópsia.**



Punção transtorácica para exsanguinação (A); Incisão com margem de segurança para biópsia de ferida (B); fragmento de pele removido para fixação em formol 10% (C) e lâminas histológicas preparadas para análise em microscópio (D). Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 2- Equações biométricas e estereológicas utilizadas**

Denominação	Equação	Unidade de medida
Área da ferida	$A=R_{ap} \times R_{ll} \times \pi$	$mm^2$
Volume da ferida	$V=A \times E$	$mm^3$
Densidade de volume	$V_v= P_p/P_t$	(%)
Densidade de perfil da área	$Q_a= P_{erfis}/A_t$	$(1/\mu m^2)$
Densidade de superfície	$S_v= 2 \times I/L$	$(\mu m^2/\mu m^3)$
Densidade de comprimento	$L_v= 2 \times Q_a$	$(\mu m/\mu m^2)$

A= área circular;  $R_{ap}$ = raio ântero-posterior;  $R_{ll}$ = raio látero-lateral; E=espessura; As taxas de retração diária da área e do volume foram obtidas pela divisão do valor da área ou do volume pelo número de dias até a eutanásia;  $P_p$ = ponto tocados no sistema teste 36 pontos;  $P_t$ = total de pontos do sistema teste (36 pontos);  $P_{erfis}$ = contagem dentro do sistema da área teste;  $A_t$ = área teste ( $262.6635 \mu m^2$ ); I= contagem de estruturas fazendo interseção nos arcos cicloides; L= comprimento linear de um arco cicloide ( $4.82759 \mu m^2$ ). Fonte: AUTOR, 2016.

### 5.8 Cálculo do número de pontos e campos

Para ser encontrado e considerando o valor estimado de campos histológicos a serem examinados, foram utilizados cálculos matemáticos, a partir do uso de equações (Figura 5) realizadas em estudos estereológicos. Para processar o cálculo destas equações, faz-se necessário a identificação dos valores de suas incógnitas, tais com: o erro padrão (EPR) de  $5\%=0,05$  e uma densidade de volume extraída da literatura, para o cálculo desta pesquisa foi considerado o ( $V_v$ ) de  $54\%=0,54$  encontrado por Khoshneviszadeh et al, 2012, assim, foi obtido um resultado igual a 184. Porém pela necessidade de correção deste valor, por ter sido considerado apenas 54%, aplicou-se uma equação de correção (Figura 5), e o número foi ajustado para 340 pontos necessários a serem utilizados nos sistemas teste para cada animal do experimento, distribuídos pelos cortes histológicos nas avaliações estereológicas (HALLY, 1964).

**Figura 5 – Equações para calcular o número de pontos e campos no estudo estereológico.**

$$EPR = \sqrt{1 - V_v} \div n$$

$$n_{\text{corrigido}} = n_{\text{calculado}} \div V_v$$

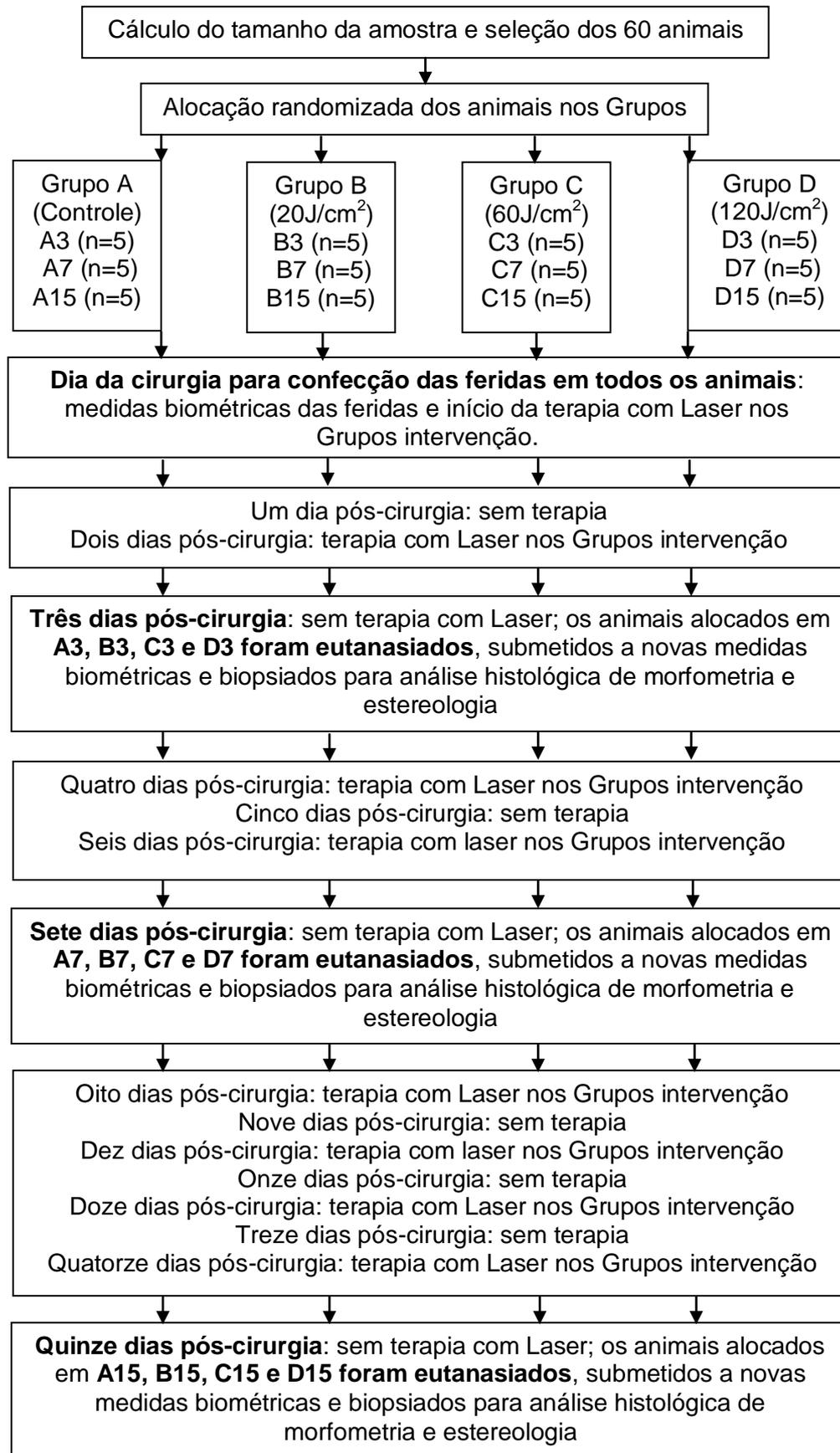
Fonte: AUTOR, 2016

Para obtenção dos 340 pontos necessários ao estudo foram utilizadas 10 imagens para cada animal, visando à obtenção da média entre os 36 pontos de um

sistema teste e as 32 extremidades nas 16 lamelas do sistema teste com arcos cicloides, encontramos o número médio de 34 pontos, que aplicados em cada uma das 10 imagens, formam os 340 pontos necessários à análise dos tecidos por estes testes estereológicos.

As imagens, obtidas nos campos histológicos e aplicadas nas quantificações morfométricas e estereológicas foram escolhidas aleatoriamente durante a visualização microscópica das lâminas histológicas, possibilitando a realização das contagens de estruturas que foram analisadas através do uso de área teste ( $A_t$ ) de  $262.6635\mu\text{m}^2$ , para calcular o  $Q_a$  e o  $L_v$ , um sistema teste com 36 pontos, com distância entre pontos de  $2.4419\mu\text{m}$ , para calcular o  $V_v$  e um teste com 16 arcos cicloides, medindo cada um  $4.82759\mu\text{m}$ , para calcular o  $S_v$  (Figura 7).

Figura 6 - Sequência dos eventos metodológicos da pesquisa.

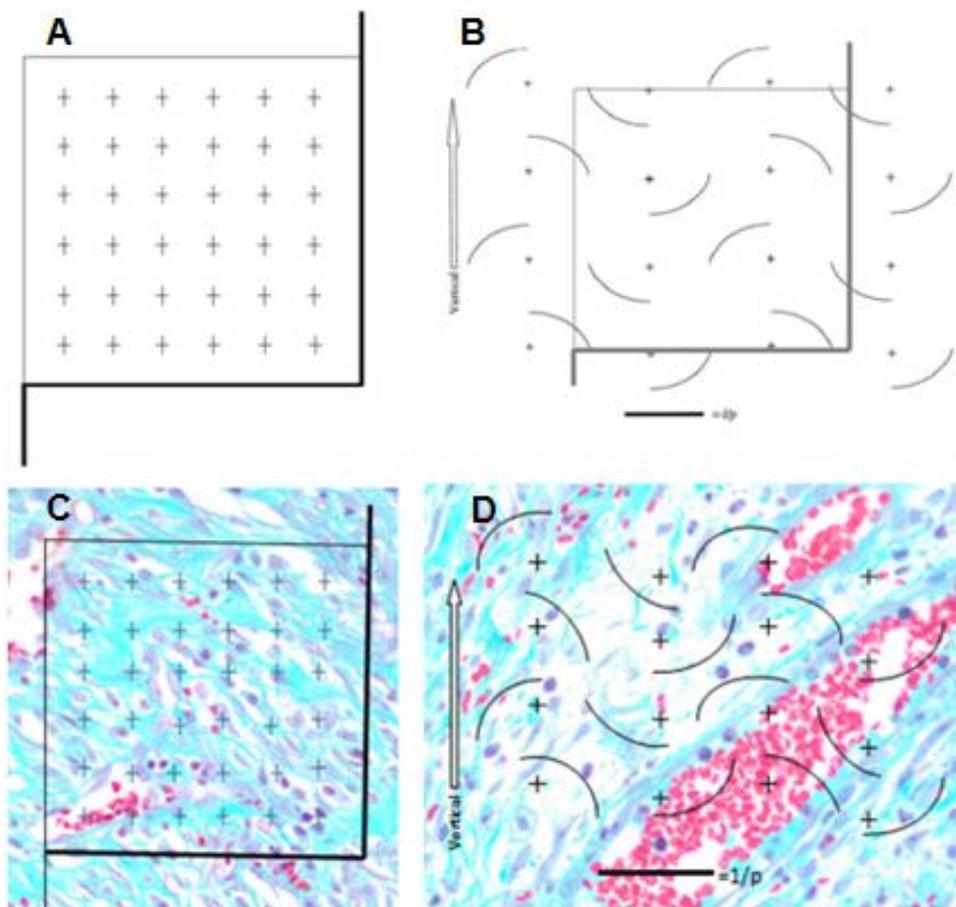


## 5.9 Variáveis

### 5.9.1 Variáveis primárias

As variáveis primárias ou dependentes visaram buscar responder a pergunta da pesquisa, e assim alcançar o objetivo do trabalho, aqui elas foram: retração da área da ferida em valores absolutos, relativos e a sua taxa diária; retração do volume da ferida em valores absolutos, relativos e a sua taxa diária; as medidas morfométricas da queratina e da porção celular do epitélio e todos os parâmetros estereológicos aqui calculados para o epitélio, fibras colágenas, fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos.

**Figura 7- Testes e método de quantificação em estereologia.**



Teste estereológico com 36 pontos (A); teste estereológico com arcos cicloides (B); demonstração do uso dos testes estereológicos sobre imagens histológicas (C e D). Fonte: AUTOR, 2016.

### 5.9.2 Variáveis secundárias

As variáveis secundárias visaram responder, porém com menos precisão, a pergunta da pesquisa quando ela não é encontrada dentre as variáveis primárias. Aqui, elas foram representadas por parâmetros estereológicos calculados para as glândulas sebáceas, folículos pilosos e músculos eretores do pelo.

Os exames de hemograma e bioquímico realizados foram dados complementares, que não respondem a pergunta da pesquisa, porém ajudam no reconhecimento da homogeneidade da amostra.

### 5.10 Estatística

Foi comparado o Grupo controle com os Grupos intervenções, como também, foram realizadas comparações entre os Grupos intervenções, usando diferentes doses de fluências na busca de encontrar doses com efetividades terapêuticas para as variáveis analisadas, através dos resultados estatísticos. Para obtenções dessas comparações, foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2007® para registro dos dados, cálculos estereológicos e obtenção das médias aritméticas e desvios padrões das variáveis estudadas. Os resultados obtidos foram transcritos para o programa GraphPad Prism versão 5.0 e processados estatisticamente utilizando o teste two-way ANOVA, com pós teste de Bonferroni. Exceção apenas para os resultados hematológicos, pois, esses dados foram processados no teste qui-quadrado. O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi sempre igual ou menor que 0,05 (5%).

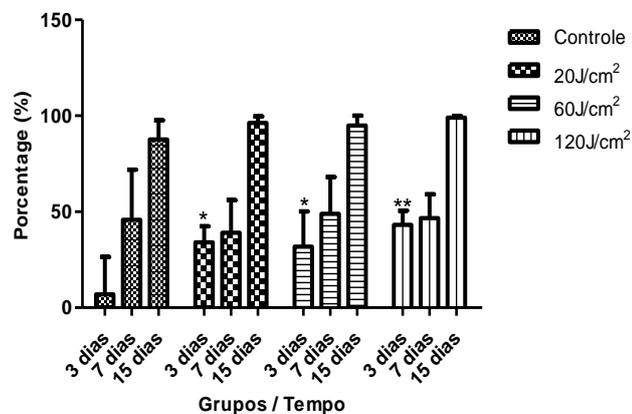
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Variáveis analisadas pela biometria

#### 6.1.1 Retração relativa da área da ferida

Das variáveis primárias pesquisadas foram encontrados resultados significantes para a intervenção na retração relativa da área da ferida ( $p=0.0257$ ) com três dias para todos os seguimentos dos grupos intervenção, porém a maior redução da área da ferida em relação à medida inicial, comparando-se com o grupo controle, ocorreu no uso da dose de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  com redução média de  $22,466\text{mm}^2$  (43.13%) e desvio padrão da média da porcentagem (DP) de 7.437. (Gráfico 1, Tabela 3 em apêndice).

**Gráfico 1- Retração relativa da área da ferida.**



(\*) para  $p<0,05$  e (\*\*) para  $p<0,05$ , representado o melhor resultado no pós-teste de Bonferroni.  
Fonte: AUTOR, 2016.

Ocorreram para algumas variáveis biométricas uma significativa interferência do tempo no reparo das feridas de pele. Foram elas: retração da área da ferida ( $p<0,05$ ), retração do volume da ferida ( $p<0,0001$ ), taxa diária da retração do volume da ferida ( $p<0,0001$ ) e volume de retração relativa da ferida ( $0,0001$ ). Já para a taxa diária da retração da área da ferida ocorreu uma significativa interação entre os fatores tempo e intervenção ( $p=0,0109$ ) (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 no apêndice).

## 6.2 Variáveis analisadas pela morfometria

Para ambas as variáveis analisadas pelo método morfométrico foi identificado significativa interações entre os fatores tempo e intervenção: para a espessura da porção celular do epitélio ( $p < 0,0001$ ) e para espessura da porção aderida da queratina ( $p = 0,0267$ ), onde os dados são apresentados nas Tabelas 9, 10 no apêndice.

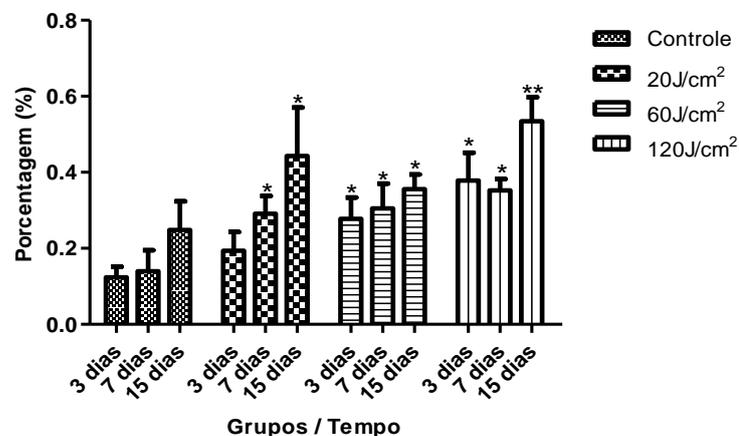
## 6.3 Variáveis analisadas pela estereologia

### 6.3.1 Fibras colágenas

#### 6.3.1.1 Densidade de volume do colágeno (Vv)

O Vv do colágeno respondeu com eficácia à intervenção ( $p < 0.0001$ ) com sete e quinze dias no grupo B e para todos os seguimentos de tempo dos grupos C e D, porém a mais significativa concentração de fibras colágenas ocorreu com quinze dias, quando foi usada dose de  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentando valor médio da Vv de 53.44% e DP de 6.30. (Gráfico 2, Tabela 11 em apêndice).

**Gráfico 2- Densidade de volume do colágeno.**



(\*) para  $p < 0,05$  e (\*\*) para  $p < 0,05$ , representado o melhor resultado no pós-teste de Bonferroni.

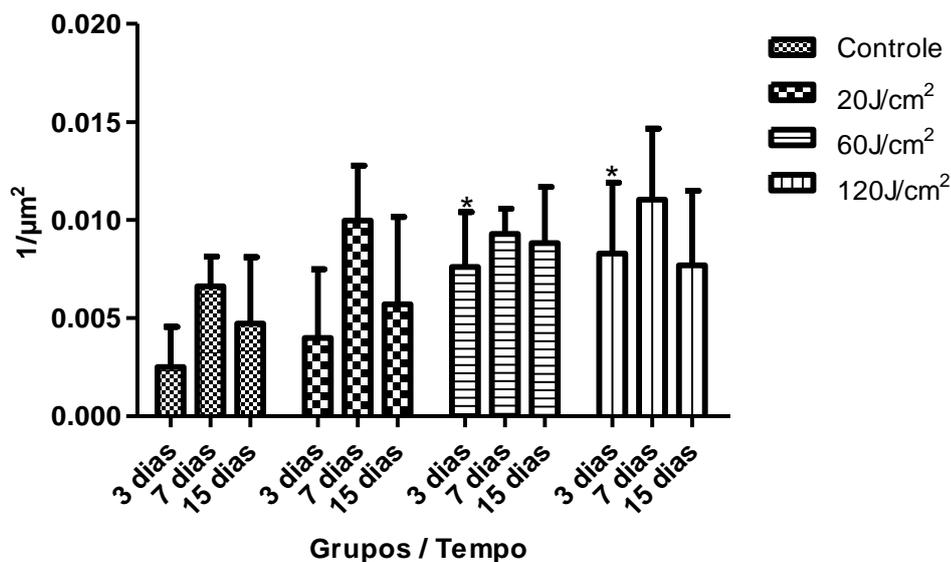
Fonte: AUTOR, 2016.

### 6.3.2 Vasos sanguíneos

#### 6.3.2.1 Densidade de perfil da área e densidade de comprimento de vasos sanguíneos (Qa e Lv)

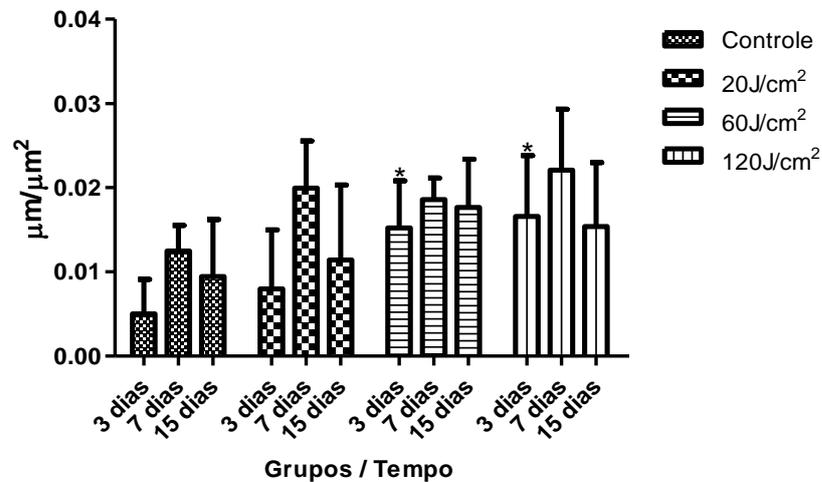
A Qa, que determina a quantidade de uma estrutura analisada dentro de uma área teste, usada sobre as imagens histológicas, e a Lv, que mensura o comprimento linear de uma estrutura dentro de uma mesma área teste, também posta sobre imagens histológicas, quando avaliadas para os vasos sanguíneos também apresentaram eficácia à intervenção, quando avaliadas para Qa ( $p < 0.0011$ ) e Lv ( $p < 0.0007$ ), ambos no período de três dias com as doses de 60 e 120J/cm<sup>2</sup>, contudo, como essas doses foram igualmente significativas e apresentaram resultados estatisticamente semelhantes, deve-se considerar que a dose de 60J/cm<sup>2</sup>, que utilizou menor tempo de aplicação do LDTBP, demonstrou melhor relação tempo-benefício na aceleração da cicatrização cutânea, mostrando Qa médio de 0.007614/μm<sup>2</sup> e DP de 0.002798 e Lv médio de 0.015229μm/μm<sup>2</sup> com DP de 0.005595. (Gráficos 3, 4; Tabelas 12, 13 em apêndice).

**Gráfico 3- Densidade de perfil da área dos vasos sanguíneos.**



(\*) para  $p < 0,05$  no pós-teste de Bonferroni. Fonte: AUTOR, 2016.

**Gráfico 4- Densidade de comprimento dos vasos sanguíneos.**

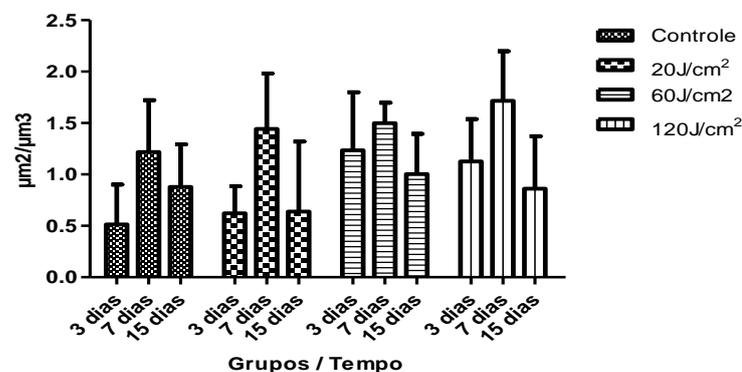


(\*) para  $p < 0,05$  no pós-teste de Bonferroni. Fonte: AUTOR, 2016.

#### 6.3.2.2 Densidade de superfície de vasos sanguíneos (Sv)

A Sv, que projeta a medida de volume de uma estrutura a partir das medidas de sua área encontrada na superfície examinada, para os vasos sanguíneos também apresentou resultado significativo ( $p < 0.0421$ ), porém não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e intervenção, por isso, não fez diferença, para esta variável estereológica, entre irradiar as feridas com LDTBP combinando comprimentos de ondas ou não (Tabela 14, Gráfico 5).

**Gráfico 5- Densidade de superfície dos vasos sanguíneos.**



O pós-teste de Bonferroni não mostrou diferenças entre os grupos. Fonte: AUTOR, 2016.

Para a densidade de volume ( $V_v$ ) dos vasos sanguíneos ocorreu interação significativa entre os fatores tempo e intervenção ( $p=0,0022$ ), onde os dados são mostrados na Tabela 15 no apêndice.

### 6.3.3 Fibroblastos

As variáveis envolvendo a análise de fibroblastos mostraram-se com significativa interação entre os fatores tempo e intervenção: densidade de volume ( $p<0,0006$ ) e na densidade de perfil da área ( $p<0,0001$ ), onde os dados são mostrados nas Tabelas 16, 17 no apêndice.

### 6.3.4 Leucócitos

Os Leucócitos identificados, a exemplo dos fibroblastos, também apresentaram resultados significantes para a interação entre os fatores tempo e intervenção: densidade de volume ( $p<0,0001$ ) e na densidade de perfil da área ( $p<0,0004$ ), onde os dados são mostrados nas Tabelas 18, 19 no apêndice.

### 6.3.5 Epitélio

A análise estereológica, usada para quantificar a densidade de volume de área ocupada pelo epitélio e queratina, apresentou resultado significativo para a interação entre os fatores tempo de intervenção ( $p<0,0001$ ), onde os dados são mostrados na Tabela 20 no apêndice.

### 6.3.6 Folículos pilosos

Em todas as análises realizadas, os folículos pilosos tiveram efeito significativo do tempo: densidade de volume ( $p=0,0001$ ), densidade do perfil da área

( $p=0,0101$ ), densidade de superfície ( $p<0,0001$ ) e densidade de comprimento ( $p=0,0045$ ), onde os dados são mostrados nas Tabelas 21, 22, 23, 24 no apêndice.

#### 6.3.7 Glândulas sebáceas

As duas análises realizadas para as glândulas sebáceas, densidade de volume e densidade do perfil da área, não se mostraram significantes ( $p>0,05$ ) para os fatores tempo e intervenção de forma isoladamente ou na interação entre estes fatores. As Tabelas 25, 26 apresentam os dados para esta variável dentro do apêndice.

#### 6.3.8 Músculos eretores dos pelos

A análise da densidade de volume e de superfície não apresentou valor significativo para a interação entre os fatores tempo e intervenção, e também para estes fatores, quando analisados isoladamente ( $p>0,05$ ). Porém, o tempo interferiu significativamente na densidade de perfil da área ( $p=0,0218$ ) e na densidade de comprimento ( $p=0,0216$ ). Os dados são apresentados nas Tabelas 27, 28, 29, 30 dentro do apêndice.

### 6.4 Análises macroscópicas e histológicas das feridas

Inspecionando as imagens macroscópicas das feridas de pele reunidas em conjunto no quadro de imagens (Figura 8), verifica-se que as feridas apresentam-se menores à medida que as imagens são comparadas da esquerda à direita, ou seja, do Grupo Controle aos Grupos intervenção, com uma maior retração nas feridas do Grupo D, principalmente com três dias de pós-operatório. Porém, também se pode verificar nas imagens esta redução do tamanho das feridas de cima para baixo, indicando que a aceleração do fechamento das feridas também está associada ao efeito do tempo, principalmente com quinze dias de pós-operatório, quando se pode encontrar, em uma das feridas do Grupo D, o seu completo fechamento. Portanto, o

tempo recebeu uma contribuição sinérgica da intervenção usando LDTBP, associando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, no avanço do fechamento das feridas de pele.

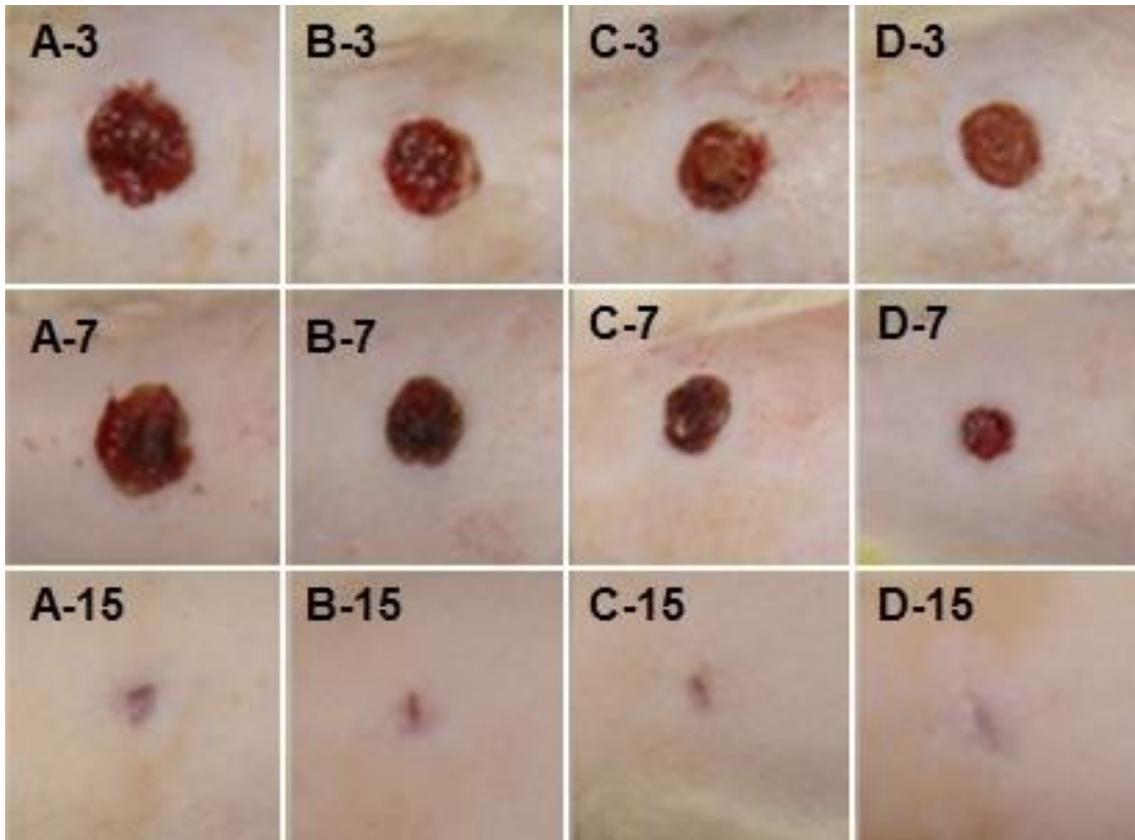
As imagens histológicas avaliadas em um estrato mais superficial da pele (Figura 9) indicam, no terceiro dia de pós-operatório, uma menor presença de fibrina no Grupo D, assim como menor presença de infiltrado inflamatório subepitelial nos seguimentos dos Grupos B-15, C-7, C-15, D-3, D-7 e D-15. O revestimento com epitélio estratificado pavimentoso queratinizado só foi identificado a partir do sétimo dia de pós-operatório nos Grupos intervenção, porém, as interdigitações dérmicas ficaram mais nítidas no décimo quinto dia de pós-operatório, principalmente nos Grupos intervenção, entretanto, neste último período avaliado, o epitélio já estava presente em todos os Grupos do experimento.

Em um nível mais profundo da pele, analisando histologicamente o tecido conjuntivo (Figura 10), percebe-se um intenso infiltrado inflamatório, que perdura até o sétimo dia de pós-operatório no Grupo controle, estando esta resposta revertida mais precocemente nos Grupos intervenção. Vasos sanguíneos também já são identificados com três e sete dias nos Grupos intervenção, principalmente nos Grupos C e D. As fibras colágenas foram presentes, ao longo do tempo experimental, de forma marcante no Grupo D, porém, com quinze dias de pós-operatório, todos os Grupos experimentais exibiram espessas fibras de colágeno em suas matrizes extracelulares.

As imagens macroscópicas e microscópicas das feridas (Figura 7, 8, 9), indicam que incrementos da dose de fluência do LDTBP e do tempo ajudam a reduzir o tamanho da lesão, promove angiogênese e aumenta a densidade de fibras colágenas, favorecendo entender que a intervenção interferiu precocemente na aceleração do processo cicatricial. Corroborando com essas informações, a dose de fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  mostrou-se com maior eficácia que as demais doses ( $20$  e  $60\text{J}/\text{cm}^2$ ), ficando isso demonstrado nos resultados indicados nas tabelas 3 e 11 no apêndice.

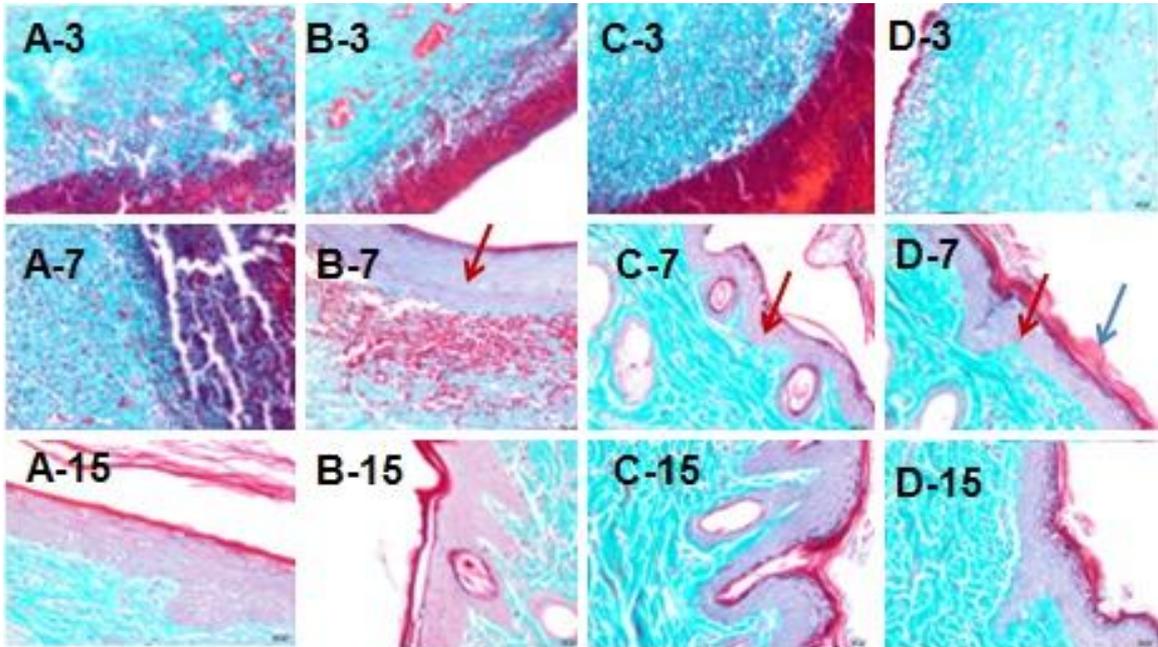
As variáveis complementares, representados pelos resultados do hemograma e bioquímicos (Gráficos de 6a a 6v e 7 no apêndice), não apresentaram diferenças significativas entre o Grupo controle e intervenção, não ocorrendo significância para os fatores tempo e intervenção isoladamente ou pela interação destes fatores ( $p>0,05$ ).

**Figura 8-** A evolução do fechamento das feridas de pele ao longo do período em relação a cada grupo do experimento.



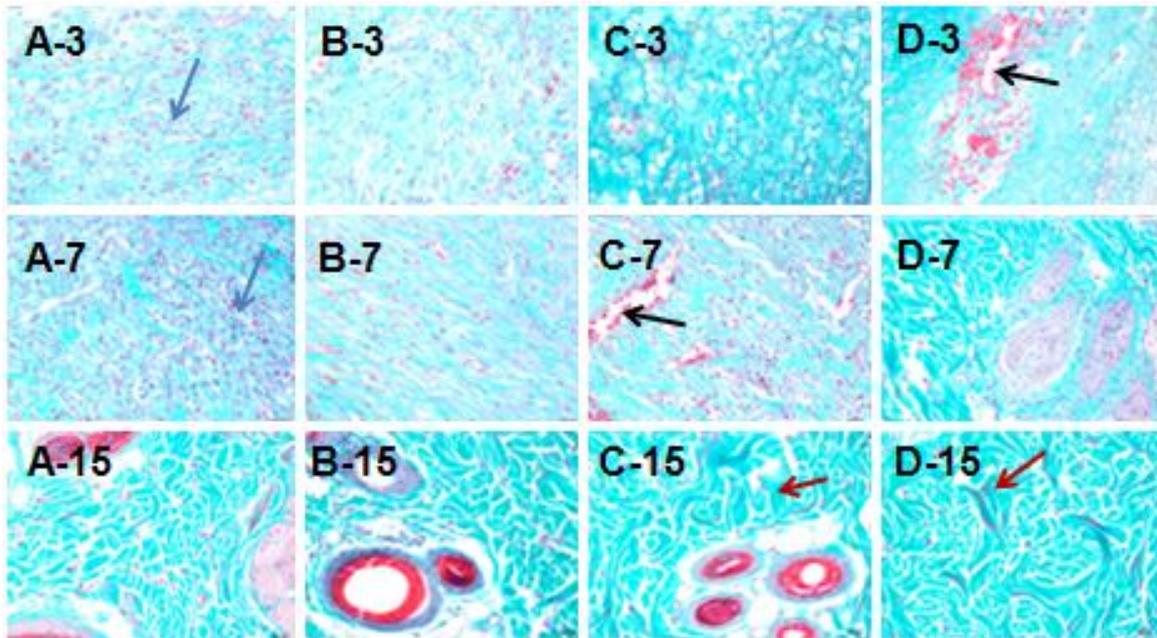
As imagens acima alinhadas nas colunas representam os grupos participantes da pesquisa, indicados pelas letras: (A) controle, (B) 20J/cm<sup>2</sup>, (C) 60J/cm<sup>2</sup> e (D) 120J/cm<sup>2</sup>. As imagens dispostas nas linhas determinam o tempo de seguimento para avaliação após a realização da ferida de pele, indicados pelos números: (3) três dias, (7) sete dias e (15) quinze dias. Juntando letra com número será identificado cada um dos três momentos de avaliação dentro dos grupos. Fonte: AUTOR, 2016.

**Figura 9 - Imagens histológicas de estruturas superficiais da ferida de pele, observadas ao longo do período, em relação a cada Grupo do experimento.**



As imagens acima mostram imagem histológica na objetiva de 40x (medida de conversão 10mm:1 $\mu$ m) em uma camada mais superficial do tecido cutâneo. As imagens das colunas representam os grupos participantes da pesquisa, indicados pelas letras: (A) controle, (B) 20J/cm<sup>2</sup>, (C) 60J/cm<sup>2</sup> e (D) 120J/cm<sup>2</sup>. As imagens dispostas nas linhas determinam o tempo de seguimento para avaliação após a realização da ferida de pele, indicados pelos números: (3) três dias, (7) sete dias e (15) quinze dias. Juntando letra com número será identificado cada um dos três momentos de avaliação dentro dos grupos. As **setas vermelhas** indicam a porção celular do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e a **seta azul** identifica uma espessa camada córnea formada predominantemente por queratina. Fonte: AUTOR, 2016.

**Figura 10 - Imagens histológicas, com ênfase na derme, da ferida de pele, observadas ao longo do período, em relação a cada Grupo do experimento.**



A figura acima também mostra imagens histológicas na objetiva de 40x (medida de conversão 10mm:1 $\mu$ m) em uma camada mais profunda, exibindo exclusivamente o tecido conjuntivo da pele. As imagens das colunas representam os grupos participantes da pesquisa, indicados pelas letras: (A) controle, (B) 20J/cm<sup>2</sup>, (C) 60J/cm<sup>2</sup> e (D) 120J/cm<sup>2</sup>. As imagens dispostas nas linhas determinam o tempo de seguimento para avaliação após a realização da ferida de pele, indicados pelos números: (3) três dias, (7) sete dias e (15) quinze dias. Juntando letra com número será identificado cada um dos três momentos de avaliação dentro dos grupos. Podem ser observada presença de vasos sanguíneos, mais precocemente em D-3, mas também em C-7 (**seta preta**). Uma crescente concentração de fibras colágenas (**coradas em verde**) à medida que observamos os grupos de A para D e à medida de aumentamos o tempo de seguimento de 3 para 15, verificando nessas imagens (**setas vermelhas**) um maior incremento de colágeno em C-15 e D-15 e intenso infiltrado inflamatório verificado principalmente em A-3 e A-7 (**seta azul**). Fonte: AUTOR, 2016.

## 7 DISCUSSÃO

O Laser de baixa potência é um recurso terapêutico reconhecido por induzir bioestimulação em nível celular (MESTER et al., 1985; SMITH, 1991), os seus diferentes comprimentos de ondas, sendo mais relatadas às vermelhas e infravermelhas (SILFVAST, 2004; GONÇALVES et al., 2010; BRANDALIZE; PHILIPS, 2016), que através de estímulos em enzimas fotossensíveis, como o citocromo C oxidase (WU et al., 2004; WONG-RILEY et al., 2005) e a abertura de canais de N-K (SMITH, 1991), promovem o aumento da absorção de oxigênio nas mitocôndrias, gerando mais energia (ATP) para as atividades celulares, tais como mitoses e sínteses proteicas, sem que para isso, cause aumento local da temperatura tecidual (PASSARELLA et al., 1984; KARU, 1988; BOLOGNANI, 1993; GRANDINÉTTI et al., 2015), desta forma, contribuindo no reparo de tecidos lesados (NASCIMENTO et al., 2004; NUSSBAUM et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2011; NOVAES et al., 2014), desde que, estes não possuam células neoplásicas (SROKA et al., 1999; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008; OLIVEIRA et al., 2015; ARDUINO et al., 2016). Estes conhecimentos oferecem um embasamento biológico para o uso do Laser, visando reparo de tecidos, como a cicatrização de feridas de pele, permitindo o entendimento do significativo incremento de fibras colágenas encontrada no presente estudo.

Artigos publicados, que compararam comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, de forma isolada e associada em terapias para fechamento de feridas de pele, demonstraram melhores resultados para o uso combinado desses comprimentos de ondas com LDTBP, aplicados na lesão em dias alternados e em modo contínuo (MENDEZ et al., 2004; PINHEIRO et al., 2009; RODRIGO et al., 2009; NOUDEH et al., 2010; SANTOS et al., 2011; CUNHA et al., 2012; LEITE et al., 2014), contudo, esses estudos não apresentam uma densidade de energia ou dose de fluência padronizada visando acelerar a cicatrização de feridas de pele. Porém, podem ser encontrados autores (MENDEZ et al., 2004; PINHEIRO et al., 2005; RODRIGO et al., 2009), que obtiveram sucesso terapêutico associando comprimentos de ondas usando fluência de energia ajustada no intervalo funcional, entre 19 e 130J/cm<sup>2</sup> (AL-WATBAN; ZHANG, 1995).

Um padrão de ajuste para a potência do LDTBP também não foi encontrado, muitas vezes foram utilizados ajustes diferentes, de acordo com o comprimento de

onda (RODRIGO et al., 2009; NOUDEH et al., 2010; SANTOS et al., 2011). Um dos artigos refere que potências mais altas em Laser de baixa potência tendem a terem melhores resultados (NASCIMENTO et al., 2004). Outros autores testaram 100mW em diferentes períodos, e identificaram, já nos primeiros momentos das avaliações, um incremento de fibras colágenas e recobrimento epitelial em feridas cutâneas de ratos (GÜNGÖRMÜS; AKYOL, 2009; CARVALHO et al., 2010).

Cada um destes autores, acima citados, utilizou uma dose de Laser diferente, não deixando clara a forma que os levou a tomada de decisão pela dose escolhida. Com base nestes artigos, no presente trabalho, optou-se por usar fluências dosadas dentro do intervalo, possível de gerar estímulos nos tecidos irradiados, indicado por Al-Watban e Zhang, (1995) e ajustamos a potência no nível mais alto disponível no aparelho que utilizamos.

A biometria mostrou-se como usual recurso para medir o fechamento das feridas de pele (NITZ et al., 2006; NOUDEH et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010), contudo, abordando apenas o fechamento da sua área, deixando de lado a medida de volume, que também leva em conta para o processo cicatricial, a formação de tecido que ocorre de dentro para fora (BALBINO; PEREIRA, CURI, 2005; KUMAR et al., 2010; TACON et al., 2011). Embora no presente estudo, tenha sido utilizadas medidas de volume, estas variáveis não apresentaram resultados significantes, já para as medidas relacionadas à redução da área, foi significativa a retração relativa da área da ferida, que levou em conta o percentual de retração em relação à área inicial.

Para o fechamento da ferida, encontramos resultados significantes com três dias, para a área de retração relativa da ferida nos grupos intervenção (grupo B= 34.05%, grupo C= 31.85% e principalmente grupo D= 43.13%), um estudo utilizando Laser diodo vermelho e infravermelho foi avaliado com auxílio de planimetria e não encontrou diferenças entre feridas de ratos saudáveis e diabéticos (NOUDEH et al., 2010), porém, outro estudo obteve melhor resultado utilizando apenas comprimento de onda vermelha (635nm e 20J/cm<sup>2</sup>) em feridas contaminadas, tendo como resultado o fechamento da área com 16.55% em 19 dias (NUSSBAUM et al., 2009). Já outros autores, utilizando comprimentos de ondas infravermelhas (904nm e 4 J/cm<sup>2</sup>) obtiveram redução da ferida em 94.76% após 20 dias (GONÇALVES et al, 2010), enquanto em nosso experimento, obtivemos 99.01% com quinze dias utilizando 120J/cm<sup>2</sup>, e também bons resultados com outras doses dos grupos

intervenção, com fechamento de 96.25% usando 20J/cm<sup>2</sup> e 94.95% usando 60J/cm<sup>2</sup>. Os bons resultados encontrados comparados com outros autores (NOUDEH et al., 2010) podem ser explicados pelo fato de não termos induzido os animais a uma comorbidade, como também, por todos os grupos intervenção terem recebido comprimentos de ondas associada, corroborado para a maior aceleração do fechamento ter ocorrido em uma fase inicial do processo de cicatrização, sugerindo uma precoce atividade de miofibroblastos, retraindo a ferida e aproximando as suas margens, em um momento, quando a fase inflamatória ainda costuma prevalecer (MEDRADO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009), propiciando melhor qualidade do tecido cicatricial em avaliações mais tardias da área reparada (BAYAT et al., 2010).

Estudos com histologia, que usaram LDTBP, apresentaram avaliações qualitativas (MENDEZ et al., 2004; RODRIGO et al., 2009; NUSSBAUM et al., 2009; SANTOS et al., 2011) e quantitativas (CARVALHO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010), entretanto, não aplicaram recursos estereológicos, por outro lado, estudos que usaram o método estereológico em pele, não utilizaram LDTBP (KAMP et al., 2009; ASHKANI-ESFAHANI et al., 2012; KHOSHNEVISZADEH et al., 2014). Desta forma, preenchemos uma lacuna na literatura do LDTBP, pois, com o uso do método estereológico, os resultados encontrados apresentam maior acurácia e níveis reduzidos vieses.

O incremento na Vv de fibras colágenas foi a variável que apresentou maior número de seguimentos de grupos com resultados significantes nas intervenções com LDTBP em relação ao grupo controle, porém dentre os seguimentos de grupo, o melhor resultado ocorreu com quinze dias para a dose de 120J/cm<sup>2</sup> onde se verificou Vv de 53.44% e DP de 6.30, outro experimento usando Laser infravermelho isoladamente com 30J/cm<sup>2</sup>, apresentou maior concentração de colágeno tipo I no vigésimo dia com apenas 37.80% e SD de 7.10 e 2.87% e SD de 2.40 de colágeno tipo III (GONÇALVES et al., 2010) portanto, somado os dois tipos de colágenos pesquisados, em maior período de tempo, não foi suficiente para alcançar os níveis encontrados em nosso estudo.

Ainda em relação ao colágeno (SANTOS et al., 2011), realizando análise qualitativa, identificou melhor disposição de fibras colágenas combinando comprimentos de ondas. Também fazendo combinação de comprimentos de ondas, usando 50J/cm<sup>2</sup>, foi verificado em três dias um expressivo acréscimo de fibras

colágenas (MENDEZ et al., 2004). Avaliando feridas distantes da tratada com LDTBP, combinando comprimentos de ondas, foram encontrados bons resultados com a dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  (RODRIGO et al., 2009). Esta pesquisa encontrou resultados significantes para o Vv de fibras colágenas usando dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  com sete e quinze dias e também usando doses de 60 e  $120\text{J}/\text{cm}^2$  com resultados significantes para todos os seguimentos de tempo testados nas intervenções. Considerando a relevante importância da presença de fibras colágenas na cicatrização de um tecido, a terapia com LDTBP associando comprimentos de ondas, mostrou-se superiores aos demais estudos analisados, sendo eficaz ao longo de todo o experimento, contudo não podemos fazer comparações usando o resultado da Vv de fibras colágenas com outros trabalhos que tenham utilizado o LDTBP, pois, esses não foram encontrados em banco de dados de artigos científicos. Usando o método estereológico, ainda assim, os valores de Vv não diferem significativamente de outros estudos que usaram recursos de estereologia em tecidos cutâneos, porém sem usar LDTBP (KHOSHNEVISZADEH et al., 2012).

Os vasos tiveram três variáveis com resultados significantes para a intervenção (Qa. LV e Sv), encontrando-se o melhor resultado para a dose de  $60\text{J}/\text{cm}^2$  com três dias, mostrando Qa de  $0.008833/\mu\text{m}^2$  com DP de 0.002867 e Lv de  $0.017665\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$  e DP de 0.005734, não havendo diferenças estatísticas neste mesmo período para dose de  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , porém, considerando o menor tempo de irradiação no uso de  $60\text{J}/\text{cm}^2$ , a torna mais vantajosa, pois se pôde obter uma angiogênese significante, com um tempo de irradiação menor, porém, para a Sv, mesmo com resultado significante, os resultados dos grupos intervenção foram semelhantes aos obtidos no grupo controle. Em estudos onde a associação de comprimentos de ondas com LDTBP se mostraram qualitativamente melhores para a nova vascularização, que o uso isolado de Lasers diodo vermelho ou infravermelho, também relataram desde cedo à presença de vasos nos tecidos cutâneos (MENDEZ et al., 2004; RODRIGO et al., 2009; SANTOS et al., 2011). Em outras terapias, sem o LDTBP, para cicatrização de feridas de pele, a Lv dos vasos foi menor que no grupo controle (KHOSHNEVISZADEH et al., 2014) ou não se mostrou com resultado significante (ASHKANI-ESFAHANI et al., 2012), demonstrando que o uso do LLDLT, principalmente combinando comprimentos de ondas, e sendo avaliado também através da estereologia, revelou-se eficaz para intensificar a

neovascularização nas feridas de pele, encurtando o tempo da fase proliferativa e precipitando a fase de remodelamento da ferida, sendo esse entendimento corroborado pelos bons resultados de incremento de fibras colágenas encontradas neste estudo.

Cinco das variáveis primárias (27,78%) tiveram resultado significativo a favor da intervenção, ficando demonstrado em quatro (22,22%) a superioridade da intervenção sobre o controle, destacando-se o desempenho para a Vv das fibras colágenas, que demonstraram incremento significativo em todos os grupos intervenção, inclusive nas avaliações realizadas com quinze dias, as demais variáveis, onde a intervenção obteve sucesso, demonstraram estatisticamente que a terapia proposta funcionou para acelerar a cicatrização da ferida cutânea com três dias, já com sete e quinze dias, a exceção da Vv das fibras colágenas, não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e o controle, porém, ainda em um dos casos onde a intervenção mostrou-se significativa (5,56%), referente à Sv dos vasos sanguíneos, o controle não se mostrou diferente da intervenção, portanto, para esta variável foi indiferente realizar a irradiação com LDTBP combinando comprimentos de ondas neste contexto metodológico apresentado. Deste modo, pode-se perceber que o LDTBP interferiu positivamente a favor da aceleração das feridas de pele em variáveis fundamentais, comprovado pelo incremento de fibras colágenas, fechamento relativo da área da ferida e angiogênese através do aumento das densidades de perfil da área e do comprimento dos vasos sanguíneos.

Para outras quatro variáveis primárias (22,22%) o fator tempo interferiu isoladamente no processo de fechamento da ferida, permitindo a interpretação de que o tempo contribuiu decisivamente e de forma mais significativa que a intervenção na cicatrização das feridas para estas variáveis. Para metade das variáveis primárias da pesquisa ocorreram interações entre os fatores tempo e intervenção, o que tornou inviável interpretar os resultados estatisticamente para estes casos, pois havendo interação não se pode afirmar se os fatores agiram isoladamente, sinergicamente ou antagonicamente a favor ou contra o desfecho da cicatriz da ferida de pele. Esses resultados mostrados não comprovam existir efeitos deletérios ao tecido cutâneo e, portanto, também não se mostram prejudiciais ao processo de cicatrização das feridas de pele.

Nas feridas de pele, irradiadas com Laser de baixa potência, células, como fibroblastos, usualmente são relatadas com resultados apresentando um aumento

em sua quantidade nos tecidos irradiados (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; ALMEIDA-LOPES, 2003; DAMANTE, 2007; ESMAEELINEJAD et al., 2014); os leucócitos, após esta terapia, costumam se apresentar em menor número nestes tecidos afetados, caracterizando redução do infiltrado inflamado (BAYAT et al., 2008; TACON et al., 2011; GÁL et al., 2009; PIRES et al., 2011; LIMA et al., 2013). Já Akyol; Güngörmüs (2010), não constatarem vantagens da bioestimulação do Laser de baixa potência para o incremento de fibroblastos e redução do infiltrado inflamatório, quando avaliado no final do processo reparador. Realizando uma avaliação quantitativa acurada, como é o caso do método estereológico, os fibroblastos e leucócitos, tiveram, para os seus resultados, interação entre os fatores tempo e intervenção, o que inviabilizou uma correta interpretação estatística sobre o efeito da intervenção com LDTBP nestas variáveis. Entretanto, considerando o aumento da densidade de volume das fibras colágenas, ocorridas ao logo de todos os períodos avaliados e para todas as doses de fluências usadas, a síntese proteica dos fibroblastos foi aumentada, assim como a resposta inflamatória também não destruiu este importante componente tecidual neoformado na cicatrização das feridas.

O método empregado por este experimento traz um ineditismo para os trabalhos que usam Laser de baixa potência, tendo em vista que, até o presente momento, apensar dos bons resultados encontrados quando os comprimentos de ondas foram associados (MENDEZ et al., 2004; RODRIGO et al., 2009; NOUDEH et al., 2010; SANTOS et al., 2011), não houve um trabalho, identificado nos bancos de dados de artigos científicos pesquisados, que buscasse comparar diferentes doses de LDTBP, todas combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas. Corroborando com esta percepção, em recentes revisões sistemáticas sobre o tema (LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014; LIMA et al., 2016), foi verificado ausência de trabalhos usando LDTBP para auxiliar na cicatrização de feridas de pele, combinando ou não comprimentos de ondas, os quais aplicassem métodos estereológicos, que se mostram adequados em encontrar resultados quantitativos, determinando diversos níveis de densidades de uma estrutura dentro do tecido, inclusive numa perspectiva com três dimensões, com boa acurácia e baixo nível de viés (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). O método utilizado no presente estudo, de forma pioneira, contemplou a comparação de diferentes doses de fluências,

associando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, como também usou avaliação estereológica para quantificar os resultados.

O experimento realizado neste estudo procurou envolver questões metodológicas discutidas, a fim de responder a pergunta da pesquisa, sobre qual seria a dose de fluência do LDTBP com a maior eficácia, no uso combinado de comprimentos de ondas vermelha e infravermelha, na aceleração da cicatrização de feridas cirúrgicas de pele em ratos Wistar. A hipótese de que a dose de fluência de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  proporcionaria a maior aceleração na cicatrização dessas feridas, usada com sucesso por Rodrigo et al., 2009, não se confirmou, pois, as doses de fluência com  $60$  e  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , usadas em nossos experimentos, obtiveram maior eficácia. Apesar do presente trabalho também ter usado fluência de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , a potência utilizada foi superior à usada por Rodrigo et al., (2009), isso pode justificar a diferença, propiciando entender que uma potência maior, emitirá uma maior carga de energia ao tecido irradiado, e este, pode absorver e responder positivamente através do reparo dos tecidos afetados.

Quanto à hipótese, referente ao melhor momento do LDTBP, assim como Mendez et al., 2004 e Rodrigo et al., 2009, o presente experimento confirmou a resposta provisória da pesquisa, pois, a maior aceleração do processo cicatricial se deu três dias após a realização da ferida, mesmo sendo no período em que existe maior infiltrado inflamatório (CAMPOS et al., 2007; FONDER et al., 2008; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008, MARTIN; NUNAN, 2015). Contudo, conforme previamente indicado por artigos, demonstrando a ação anti-inflamatória e aumento da drenagem linfática induzidas pelo Laser de baixa potência, o perfil inflamatório, comumente verificado sem esta terapia, foi amenizado (VIEGAS et al., 2007; GÁL et al., 2009; PIRES et al., 2011; LIMA et al., 2013; MARINHO et al., 2013; MORAES et al., 2013). A melhora acentuada, ocorrendo nos primeiros dias de tratamento, pode indicar a possibilidade de um período terapêutico mais curto com o LDTBP combinando comprimentos de ondas, assim como abre caminho para uma evolução favorável à cura da ferida.

Todo o seguimento do experimento se deu conforme o planejado, sem intercorrências significativas, nem interrupções. Não houve registro de perdas de animais, nem a necessidade de exclusões, portanto, foi possível analisar toda a amostra, não ocorrendo desequilíbrio quantitativo de participantes entre os quatro grupos estudados. O grupo controle, usado no presente trabalho, não passou por

nenhuma simulação de tratamento, pois, considerando que foram usados três níveis diferentes de fluência, provocando também variações no tempo de irradiação entre os grupos intervenção, teríamos que criar mais dois grupos controle, permitindo assim deixar um grupo controle para cada grupo intervenção, e isto causaria um aumento no tamanho da amostra em mais 30 animais, gerando uma dificuldade ética para a aprovação e desenvolvimento do trabalho.

As feridas cirúrgicas em pele de rato Wistar responderam à intervenção com a associação dos comprimentos de ondas vermelha e infravermelha, principalmente contribuindo com a área de retração relativa da ferida, para qual a intervenção funcionou melhor usando  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , e na angiogênese, representados pelo Qa e Lv dos vasos, para esses resultados, as doses significantes foram de 60 e  $120\text{J}/\text{cm}^2$ , ambas avaliadas com três dias de pós-operatório, contudo, dentre estas doses, o menor tempo de irradiação, nos faz entender que a melhor dose de fluência seja, para estas variáveis,  $60\text{J}/\text{cm}^2$ . Porém, a Vv das fibras colágenas, que apresentaram resultados significantes ao longo de todo período experimental analisado, mostrou-se melhor quando a dose de fluência administrada foi de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  com quinze dias de pós operatório. Portanto, a dose de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  consegue exercer influência com maior significância em todas as variáveis onde a intervenção se mostrou melhor que o controle.

Para as próximas pesquisas, visando avaliar cicatrizações de feridas de pele em animais, pode-se aprofundar o estudo, adicionando outros métodos, avaliando variáveis como: elasticidade cutânea, ritmo de substituição das fibras colágenas tipo III por fibras do tipo I, comportamento de mediadores pró e anti-inflamatórias e a eficácia dessa terapia em feridas de pele de animais portadores de morbidades sistêmicas, como diabetes e obesidade, ou locais, como feridas infectadas, ou comportamentais, como o tabagismo (NUSSBAUM et al., 2009; NOUDEH et al., 2010, GARCIA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; LEITE et al., 2015) ou mesmo deficiência de cicatrização (RUIZ, 2015). Os resultados encontrados neste estudo devem servir como ponto de partida, podendo merecer ajustes no método a depender do contexto experimental de futuras pesquisas, como por exemplo: manter a dose de fluência fixa em  $120\text{J}/\text{cm}^2$  e variar o ajuste da potência; aplicar a terapia diariamente; reduzir a quantidade de pontos irradiados na ferida; aplicar técnica de varredura ou mudar para o modo pulsátil.

A partir dos resultados aqui obtidos, e complementados com a realização de futuros experimentos, aprofundando o conhecimento exposto neste estudo, técnicas que utilizem o LDTBP, combinando comprimentos de ondas, poderão ser usadas com propostas de protocolos a serem exploradas em ensaios clínicos randomizados, visando prevenir ou acelerar a reparação de feridas agudas e crônicas, que afetem pele e mucosas de seres humanos, sendo também uma oportunidade para avaliar a efetividade no controle da dor, pois, considerando o bom desempenho em variáveis importantes nesse estudo experimental, mas sem querer extrapolar uma previsão de resultados, pode-se interpretar como plausível, que o LDTBP, associando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas, também possa obter bons resultados em feridas de pele e mucosas de seres humanos, mas para isso, novos testes precisarão ser conduzidos de acordo com preceitos éticos e científicos.

## 8 CONCLUSÃO

O protocolo que melhor contribui para o reparo da ferida de pele em ratos Wistar apresenta os seguintes parâmetros presentes no Grupo D:

- Fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$ ;
- Potência de  $100\text{mW}$ ;
- Energia de  $3,2\text{J}$ ;
- Tempo de 32 segundos;
- Spot Size (Área de saída do Laser):  $\sim 0,254\text{cm}^2$ ;
- Intensidade de  $393,7\text{ mW}/\text{cm}^2$ ;
- Modo contínuo;
- Posologia: em dias alternados;
- Combinando comprimentos de ondas  $660$  e  $808\text{nm}$ ;
- Aplicados em quadro pontos distintos da ferida;
- Durante 15 dias após a confecção da ferida.

O LDTBP usado combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas contribui promovendo a maior aceleração da cicatrização das feridas de pele em ratos Wistar com três dias após a cirurgia;

As variáveis que respondem significativamente à intervenção com LDTBP combinando comprimentos de ondas vermelhas e infravermelhas são:

- a) Retração relativa da área da ferida;
- b) Densidade de volume das fibras colágenas;
- c) Angiogênese através das densidades de perfil da área e de comprimento dos vasos sanguíneos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LOPES L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade usando diferentes parâmetros de irradiação.** 189f. Dissertação (Doutorado em Ciências e Engenharias de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos – SP, 2003.
- ALMEIDA-LOPES L. et al. Comparison of the Low Level Laser Therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg. Med.**, v.29, p. 179-84, 2001.
- AL-WATBAN F.A.H.; ZHANG X.Y. Comparison of the effects of laser therapy on wound healing using different laser wevelengths. **Laser Ther.**, v.8, p.127-35, 1996.
- AL-WATBAN F.A.H.; ZHANG X.Y. Stimulative and inhibitory effects of low incident levels of argon laser energy on wound healing. **Laser Ther.**, v.7, p. 11-8, 1995.
- ARDUINO P.G. et al. randomized pilot study to assess the safety and the value of low-level laser therapy versus clonazepam in patients with burning mouth syndrome. **Lasers Med. Sci.**, v.31, n. 4, p. 811-16, 2016.
- ASHKANI-ESFAHANI S. et al. Glucosamine Enhances Tissue Regeneration in the Process of Wound Healing in Rats as Animal Model: A Stereological Study. **J. Cytol. Histol.**, v.3, n.4, p1-5, 2012.
- BALBINO C.A.; PEREIRA L.M.; CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. de Ciênc. Farm.**, v.41, n.1 p.27-51, 2005.
- BAYAT M. et al. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. **J. of Rehabilitation Research Development.**, v.45, n.6, p.931-938, 2008.
- BAYAT M.; AZARI A.; GALMOHAMMADI M.G. Effects of 780nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. **Photomed. Laser Surg.**, v.28, n.4, p.465-470, 2010.
- BEM D.M. et al. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades de ultrassom. **Rev. Bras. Fisioter.**, São

Carlos, v. 14, n. 2, p. 114-20, mar./abr. 2010.

BOLOGNANI L. ATPase and ATPsynthetase activity in myosin exposed to low Power laser and pulsed electromagnetic fields. **Bioeletrochem. Bioenerg.**, v.32, p.155-64, 1993.

BRANDALIZE M.C.M.; PHILIPS J. Padrões de classificação de equipamentos laser utilizados em levantamentos terrestres e aéreos. p.1-9. Disponível em: <<http://www.lidar.com.br/arquivos/PadroesSegurancaLaser.pdf>> Acessado em 11 de março de 2016.

CAMPOS A.C.L.; BORGES-BRANCO A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v.20, n.1, p.51-8, 2007.

CARVALHO P.T.C. et al. Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. **Acta. Cir. Bras.**, v.25, n.1, p. 71-9, 2010.

CATALANI F. **Caracterização de Laser de diodo para espectroscopia de alta resolução**. 76f. Dissertação (Mestrado em Física)- Instituto de Física (Gleb Wataghin), UNICAMP – Campinas-SP, 1997.

CRUZ-ORIVER L.M.; WEIBEL E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.148-56, 1990.

CUNHA C.B. et al. Effect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis. **Lasers Med. Sci.**, v.27, p.1233–40, 2012.

CURY V. et al. The effects of 660nm and 780nm irradiation on viability of random skin flap in rat. **Photomed. Laser Surg.**, v.27, n.5, p.721-4, 2009.

DADPAY M. et al. Effects of pulsed infra-red level-laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats by biomechanical evaluation. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.111, p.1-8, 2012.

DAMANTE C.A. **Efeito da terapia com laser de baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos**. 91f. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo-SP, 2007.

DAMANTE C.A. ET al. Clinical evaluation of the effects of low intensity laser (gaalas) on wound healing after gingivoplasty in humans. **J. Appl. Oral. Sci.**, v.12, n.5, p.133-6, 2004.

DAMANTE C.A. et al. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. **Lasers Surg. Med.**, v.35, p. 377–84, 2004.

ESMAEELINEJAD M. et al. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, n. 1, p.121-9, 2014.

FONDER M.A. et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.58, p.185-206, 2008.

FUJII N. et al. Cutaneous vascular and sweating responses to intradermal administration of ATP: a role for nitric oxide synthase and cyclooxygenase? **J. Physiol.**, v.593, n.11, p. 2515–25, 2015.

GÁL P. et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low - level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid - treated rats. **Lasers Med. Sic.**, v.24, p.539-47, 2009.

GÁL P. et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.4, p.480-8, 2006.

GARCIA V.G. et al. Influence of low-level laser therapy on wound healing in nicotine-treated animals. **Lasers Med. Sci.**, v.27, p.437-43, 2012.

GONÇALVES R.V. et al. Comparative study of the effects of Gallium-Aluminium-Arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wound in wistar rats: A histomorphometric study. **Phomed. Laser Surg.**, v.5, p.597-602, 2010.

GONÇALVES R.V. et al. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.43, n.4, p.350-5, 2010.

GRANDINÉTTI V.S. et al. The thermal impact of phototherapy with concurrent super-pulsed lasers and red and infrared LEDs on human skin. **Lasers Med. Sci.**,

v.30, p. 1575-81, 2015.

GUFFEY J.S.; WILBORN J. Effects of Combined 405-nm and 880-nm Light on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in Vitro. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.6, p. 680-3, 2006.

GÜNGÖRMÜS M.; AKYOL U. The effect of gallium-aluminum-arsenide 808nm low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser. **Photomed. Laser Surg.**, v.27, n.6, p.895-9, 2009.

HALL R.N. et al. Coherent light emission from GaAs junctions. **Phys. Rev. Lett.**, v.9, n.9, p.366-9, 1962.

HALLY A.A. Counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopic sections. **Quarterly J. Microsc. Sci.**, v.105, p.503-17, 1964.

KAMP S. et al. Application of stereology to dermatological research. **Exp. Dermatol.**, v.18, p. 1001-9, 2009.

KARU T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci.**, v.2, n.1, p. 53-74 1988.

KHOSHNEVISZADEH M. et al. Topical Simvastatin Enhances Tissue Regeneration in Full-Thickness Skin Wounds in Rat Models. **Iran J. Pharm. Res.**, v.13, n.1, p. 263-9, 2014.

KILKENNY C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guideline for reporting animal research. **Vet. Clin. Pathol.**, v.41, n.1, p. 27-31, 2012.

LEITE S.N. et al. Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. **Lasers Med. Sci.**, v.30, p. 1481–1488, 2015.

LEITE S.N. et al. Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats. **An. Bras. Dermatol.**, v.89, n.6, p. 899-904, 2014.

LIMA A.A.M. et al (2013) Evaluation of corticosterone and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, n. 2, p. 709-15, 2014.

LIMA F.J.C. et al. Is there a protocol in experimental skin wounds in rats using low-level diode laser therapy (LLDLT) combining or not red and infrared wavelengths? Systematic review. **Lasers Med. Sci.**, v.31, n. 4, p. 779-87, 2016.

LIMA F.J.C.; Barbosa F.T.; Sousa-Rodrigues C.F. Use alone or in Combination of Red and Infrared Laser in Skin Wounds. **J. Lasers Med. Sci.**, v.5, n.2, 2014.

MARDARIM-DE-LACERDA C.A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Braz. Acad. Sci.**, v.75, n.4, p. 469-86, 2003.

MARINHO R.R. et al. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.121, p.86-93, 2013.

MARTIN P.; NUNAN R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **Br. J. Dermatol.**, v.173, p.370-8, 2015.

MEDRADO A.P. et al. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing, **J. Photochem. Photobiol.**, v.92, p.144-52, 2008.

MENDEZ T.M.T.V. et al. Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. **J. Clin. Laser Med. Sur.**, v.22, n.1, p.19-25, 2004.

MESTER E.; MESTER A.F.; MESTER A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, v.5, p.31-9, 1985.

MORAES J.M. et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers Med. Sci.**, v.28, p.1169-76, 2013.

NASCIMENTO P.M.N. et al. Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in Rats. **J. Clin. Laser Med. Sur.**, v.22, n.6, p.513-8, 2004.

NITZ, A.C. et al. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arq. Catar. Med.**, v.35, n.4, p.74-9, 2006.

NOUDEH Y.J. et al. Combination of 670nm and 810nm Diode Lasers for Wound Healing Acceleration in Diabetic Rats. **Photomed. Laser Surg.**, v.28, n.5, p. 621–7, 2010.

NOVAES R.D. et al. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. **Int. J. Exp. Path.**, v.95, p.138-46, 2014.

NUSSBAUM E.L. et al. Effects of Low Intensity Laser Irradiation During Healing of Skin Lesions in the Rat. **Lasers Surg. Med.**, v.41, p. 372–81, 2009.

OLIVEIRA R.F. et al. Laser therapy in the treatment of paresthesia: a retrospective study of 125 clinical cases. **Photomed. Laser Surg.**, v.33, n.8, p.415-23, 2015.

PASSARELLA S. et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett.**, v.175, n.1, p.95-9, 1984.

PEREIRA P.R. et al. Effects of low intensity laser in vitro bacterial culture and in vivo infected wounds. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.41, n.1, p.49-55, 2014.

PINHEIRO A.L.B. et al (2005) Polarized light (400-2000nm) and non-ablative laser (685nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.5, p.485-92, 2005.

PINHEIRO A.L.B. et al. Biomodulative Effects of Visible and IR Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds of Nourished and Undernourished Wistar Rats. **Photomed. Laser Surg.**, v.27, n.6, p.947–57, 2009.

PIRES D. et al. Low-level laser therapy (LLLTT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med. Sci.**, v.26, p.85-94, 2011.

PROCKT A.P.; Takahashi A.; Pagnoncelli R.M. Uso de Terapia com Laser de Baixa Intensidade na Cirurgia Bucocomaxilofacial. **Rev. Port. Estomatol. Cir. Maxilofac.**, v.49, p.247-55, 2008.

RIBEIRO M.A.G. et al. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660nm. **Photomed. Laser Surg.**, v.27, n.1, p.49-55, 2009.

RODRIGO S.M. et al. Analysis of the systemic effect of red and Infrared laser therapy on wound repair. **Photomed. Laser Sur.**, v.27, n.6, p. 929–35, 2009.

RUBIO C.R. et al. Helium-Neon laser reduces the inflammatory process of arthritis. **Photomed. Laser Sug.**, v.28, n.1, p.125-9, 2010.

RUIZ R.O. et al. Uso do tamoxifeno para o tratamento de quelóides. **Rev. Soc. Bras. Cir.**, Plást. v.20, n.4, p.225-30, 2005.

SANTOS, N.R.S. et al. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by staphylococcus aureus. **Photomed. Laser Sur.**, v.29, n.3, p.177-82, 2011.

SILFVAST W.T. **Lasers Fundamentals**, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, 2004, p 576-596.

SILVEIRA P.C.C. et al. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in a animal model of wound healing. **Laser Med. Sci.**, v.26, p.125-31, 2011.

SMITH K.C. The photobiological basis of low level radiation therapy. **Laser Ther.**, v.3, p.19-24, 1991.

SOUZA TM, FIGHERA RA, KOMMERS GD, BARROS CSL, Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatologia. **Pesq. Vet. Bras.** 29(2):177-190, fevereiro 2009

SROKA R. et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wevelengths. **Lasers in Surg. and Med.**, v.25, p.263-71, 1999.

TACON K.C.B. et al. Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta. Cir. Bras.**, v.26, n.5, 373-8, 2011.

TAZIMA M.F.G.S.; VICENTE Y.A.M.V.A.; MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.41, n.3, p.259-64, 2008.

VIEGAS V.N. ET AL. Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory Reactions

during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. **Phomed. Laser Surg.**, v.25, n.6, p.467-473, 2007.

WONG-RILEY M. T. T. et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 6, p. 4761-71, 2005.

WU Z.H. et al. Mitochondrial signalling for histamine releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cells. **Laser Surg. Med.**, v.42, p.503-9, 2004.

ZGHEIB C.; XU J.; LIECHTY K.W. Targeting inflammatory cytokines and extracellular matrix composition to promote wound regeneration. **Adv. Wound Care**, v.3, n.4, p.344-55, 2014.

## APÊNDICE A - Ficha de registro de dados do experimento

po	Morfo		Epitélio			Folículo			Gl Sebácea			Mm pelo			Fibroblastos			F. Colágenas			Vasos				Leucócitos			
	Ep	Que	Pp	Vv	L(l)	Pf	Pp	L(l)	Pf	Pp	L(l)	Pf	pp	L(l)	Pf	Pp	L(l)	Pp	Vv	L(l)	Pf	Pp	L(l)	Lv	Pf	Pp	L(l)	
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												
Σ																												

Identificação do animal:

\*Pf= perfil por área \*Qa= densidade de área (c/área proibida) \* Pp= pontos tocados \* Vv= (densidade de volume)=Pp/Pt \*L(l)= interseção nas lamelas dos arcos cicloides \*Lv= densidade de comprimento (Lv=2xQa)

Registrar o tipo de teste estereológico utilizado:

Início do experimento	Final do experimento	Saldo
Raio ântero-posterior (Ra-p')=	Raio ântero-posterior (Ra-p'')=	A'-A''= (o quanto contraiu na área)=
Raio látero-lateral (RI-l')=	Raio látero-lateral (RI-l'')=	V'-V''= (o quanto contraiu no volume)=
Espessura média 3 pontos (E')=	Espessura média 3 pontos (E'')=	Ra-p' - Ra-p''= (redução eixo a-p)=
Área da superfície da ferida (A')=	Área da superfície da ferida (A'')=	RI-l'- RI-l'' = (redução eixo l-l)=
Volume da área da ferida (V')=	Volume da área da ferida (V'')=	E' - E''= (redução da espessura)=

Espessura do Epitélio''	Central=	Direita=	Esquerda=
Espessura da queratina	Central=	Direita=	Esquerda=
Presença de queratina	Presente em todos ( )	Presente em alguns ( )	Ausente ( )
Epitélio	Presente em todos ( )	Presente em alguns ( )	Ausente ( )
Interdigitações dérmicas	Bem definida ( )	Suave ( )	Ausente ( )
Pressão Arterial:	Hemograma:	Bioquímica:	Outros:

Fonte: AUTOR, 2016.

## APÊNDICE B - Tabelas de resultados para as quais a intervenção não teve eficácia confirmada

**Tabela 3- Área de retração relativa da ferida (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	6,93(+/-19,546)	34,05(+/-8,419)*	31,85(+/-18,348)*	43,13(+/-7,437)**
7	45,77(+/-26,137)	39,05(+/-17,059)	48,93(+/-19,162)	46,65(+/-12,406)
15	87,64(+/-10,085)	96,25(+/-3,43)	94,95(+/-5,051)	99,01(+/-0,976)

\* p<0,05

Interação entre tempo e intervenção (p> 0.05) e (p < 0.05) para o fator intervenção.

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 4- Retração da área da ferida (mm<sup>2</sup>).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	4,182 (+/-10,762)	18,094(+/-5,393)	15,28(+/-11,026)*	22,466(+/-4,15)*
7	27,038 (+/-15,848)	23,842(+/-12,908)	26,458 (+/-9,723)	25,38(+/-8,043)
15	48,524(+/-3,408)	50,75(+/-2,282)	50,802(+/-2,878)	53,38(+/-4,818)

Para esta variável não houve interações entre os fatores tempo e a intervenção (p>0,05), o fator intervenção não foi significativo (p>0,05), mas o fator tempo foi (p<0,05). Para o teste de Bonferroni (\*) indica p<0,05. Fonte: AUTOR, 2016

**Tabela 5- Retração do Volume da ferida (mm<sup>3</sup>).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	6.423(+/-1.220)	7.739(+/-1.085)	7.057(+/-1.964)	8.258(+/-0.791)*
7	9.288(+/-1.134)	9.129(+/-1.376)	8.966(+/-0.643)	8.050(+/-0.769)
15	10.243(+/-0.528)	10.107(+/-0.506)	10.195(+/-0.618)	10.427(+/-0.908)

Para esta variável não houve interações entre os fatores tempo e a intervenção (p>0,05), o fator intervenção não foi significativo (p>0,05), mas o fator tempo foi (p<0,05). Para o teste de Bonferroni (\*) indica p<0,05. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 6- Taxa diária de retração do volume da ferida (mm<sup>3</sup>).**

Group Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	2,141 (+/-0,406)	2,579 (+/-0,361)*	2,352 (+/-0,654)	2,752 (+/-0,263)*
7	1,326 (+/-0,162)	1,304 (+/-0,196)	1,280 (+/-0,091)	1,150 (+/-0,109)
15	0,682 (+/-0,035)	0,673 (+/-0,033)	0,679 (+/-0,041)	0,695 (+/-0,060)

Para esta variável não houve interações entre os fatores tempo e a intervenção (p>0,05), o fator intervenção não foi significativo (p>0,05), mas o fator tempo foi (p<0,05). Para o teste de Bonferroni (\*) indica p<0,05. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 7- Volume de retração relativo da ferida (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	61.895(+/-11.759)	75.791(+/-10.630)	80.105(+/-22.299)*	81.496(+/-7.813)*
7	81.737(+/-9.980)	79.697(+/-12.012)	84.736(+/-6.085)	76.894(+/-7.348)
15	94.505(+/-4.877)	98.529(+/-4.936)	97.849(+/-5.931)	99.545(+/-8.669)

Para esta variável não houve interações entre os fatores tempo e a intervenção ( $p > 0,05$ ), o fator intervenção não foi significativo ( $p > 0,05$ ), mas o fator tempo foi ( $p < 0,05$ ). Para o teste de Bonferroni (\*) indica  $p < 0,05$ . Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 8- Taxa diária de retração da área da ferida (mm<sup>2</sup>).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	1,394 (+/-3,587)	6,031 (+/-1,797)*	5,093 (+/-3,675)*	7,488 (+/-1,383)*
7	3,862 (+/-2,263)	3,406 (+/-1,844)	3,779 (+/-1,388)	3,625 (+/-1,148)
15	3,234 (+/-0,227)	3,383 (+/-0,152)	3,386 (+/-0,191)	3,558 (+/-0,321)

\* $p < 0,05$  para o teste de Bonferroni.  $P < 0,05$  para interação entre os fatores tempo e intervenção. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 9- Espessura da porção celular do epitélio (µm).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0.515(+/-0.819)	1.094(+/-2.282)	2.261(+/-1.706)	4.888(+/-1.338)*
15	8.036(+/-1.607)	5.036(+/-1.349)*	9.497(+/-1.485)	6.883(+/-1.994)

\* $p < 0,05$  para o teste de Bonferroni.  $P < 0,05$  para interação entre os fatores tempo e intervenção. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 10- Espessura da porção aderida da queratina (µm).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0.028(+/-0.045)	0.022(+/-0.051)	0.146(+/-0.83)	0.591(+/-0.411)*
15	0.412(+/-0.070)	0.512(+/-0.135)*	0.553(+/-0.394)	0.640(+/-0.300)

\* $p < 0,05$  para o teste de Bonferroni.  $P < 0,05$  para interação entre os fatores tempo e intervenção. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 11- Densidade de volume do colágeno (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,123(+/-0,027)	0,193(+/-0,048)	0,277(+/-0,055)*	0,378(+/-0,073)*
7	0,139(+/-0,055)	0,291(+/-0,046)*	0,305(+/-0,065)*	0,352(+/-0,030)*
15	0,248(+/-0,075)	0,443(+/-0,126)*	0,355(+/-0,038)*	0,534(+/-0,063)**

\*  $p < 0,05$

Interação entre tempo e intervenção ( $p > 0,05$ ) e ( $p < 0,05$ ) para o fator intervenção. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 12- Densidade de perfil da área dos vasos sanguíneos ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,002(+/-0,002)	0,003(+/-0,003)	0,007(+/-0,002)*	0,008(+/-0,003)*
7	0,006(+/-0,001)	0,009(+/-0,002)	0,009(+/-0,001)	0,011(+/-0,003)
15	0,004(+/-0,003)	0,005(+/-0,004)	0,008(+/-0,002)	0,007(+/-0,003)

\*p<0,05 Interação entre tempo e intervenção (p> 0.05) e (p < 0.05) para o fator intervenção.

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 13- Densidade de comprimento dos vasos sanguíneos ( $1/\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,005(+/-0,004)	0,007(+/-0,007)	0,015(+/-0,005)*	0,016(+/-0,007)*
7	0,012(+/-0,003)	0,019(+/-0,005)	0,018(+/-0,002)	0,022(+/-0,007)
15	0,009(+/-0,006)	0,011(+/-0,008)	0,017(+/-0,005)	0,015(+/-0,007)

\*p<0,05

Interação entre tempo e intervenção (p> 0.05) e (p < 0.05) para o fator intervenção.

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 14- Densidade de superfície dos vasos sanguíneos ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,513(+/-0,388)	0,621(+/-0,262)	1,234(+/-0,563)	1,126(+/-0,411)
7	1,218(+/-0,504)	1,441(+/-0,539)	1,499(+/-0,197)	1,715(+/-0,483)
15	0,878(+/-0,413)	0,638(+/-0,681)	1,002(+/-0,391)	0,861(+/-0,510)

Não houve interações entre os fatores tempo e a intervenção (p> 0.05) e o fator intervenção (p<0.05).

Porém o teste de Bonferroni demonstrou que não existiram diferenças entre os grupos intervenção e o grupo controle para esta variável, entretanto observa-se um precoce aumento da densidade de superfície com três dias nos grupos C e D. Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 15- Densidade de volume dos vasos sanguíneos (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,233(+/-0,024)	0,021(+/-0,010)	0,046(+/-0,017)	0,070(+/-0,038)*
7	0,034(+/-0,015)	0,063(+/-0,023)	0,048(+/-0,020)	0,058(+/-0,021)
15	0,021(+/-0,013)	0,016(+/-0,015)	0,038(+/-0,011)	0,025(+/-0,013)

\*P<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 16- Densidade de volume do fibroblasto (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,002(+/-0,002)	0,003(+/-0,003)	0,012(+/-0,001)	0,012(+/-0,008)
7	0,008(+/-0,005)	0,026(+/-0,006)	0,040(+/-0,016)*	0,055(+/-0,005)*
15	0,012(+/-0,011)	0,016(+/-0,009)	0,061(+/-0,018)*	0,051(+/-0,024)*

\*P<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 17- Densidade de perfil da área do fibroblasto ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,002(+/-0,001)	0,004(+/-0,002)	0,014(+/-0,002)*	0,026(+/-0,007)*
7	0,005(+/-0,001)	0,020(+/-0,005)	0,046(+/-0,007)*	0,074(+/-0,015)**
15	0,008(+/-0,004)	0,020(+/-0,011)	0,085(+/-0,023)	0,074(+/-0,033)*

\*p<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.  
Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 18- Densidade de volume dos leucócitos (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,047(+/-0,021)	0,013(+/-0,004)*	0,010(+/-0,003)*	0,021(+/-0,006)*
7	0,061(+/-0,018)	0,019(+/-0,005)*	0,011(+/-0,005)*	0,007(+/-0,004)*
15	0,013(+/-0,007)	0,003(+/-0,004)	0,003(+/-0,002)	0,005(+/-0,004)

\*p<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.  
Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 19- Densidade de perfil da área do leucócito ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0,115(+/-0,044)	0,037(+/-0,009)*	0,027(+/-0,005)*	0,041(+/-0,003)*
7	0,106(+/-0,033)	0,054(+/-0,008)*	0,027(+/-0,004)*	0,026(+/-0,012)**
15	0,031(+/-0,015)	0,009(+/-0,008)	0,014(+/-0,004)	0,007(+/-0,002)

\*p<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.  
Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 20- Densidade de volume do epitélio (%).**

Grupo Dia	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0.000 (+/-0.00)	0.000 (+/-0.00)	0.000 (+/-0.00)	0.000 (+/-0.00)
7	0.000 (+/-0.00)	0.087 (+/-0,184)	0.150 (+/-0.094)*	0.383 (+/-0.059)**
15	0.560 (+/-0.089)	0.405 (+/-0,105)*	0.648 (+/-0.080)	0.536 (+/-0.117)

\*p<0,05 para o teste de Bonferroni. P<0,05 para interação entre os fatores tempo e intervenção.  
Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 21- Densidade de volume do folículo piloso (%).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	0,002 (+/-0,006)	0,010 (+/-0,001)	0,006 (+/-0,012)	0,023 (+/-0,025)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 22- Densidade de perfil da área do folículo piloso ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0,0003 (+/-0,0006)
15	0,00007 (+/-0,0001)	0,0008 (+/-0,001)	0,0004 (+/-0,001)	0,001 (+/-0,001)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 23- Densidade de superfície do folículo piloso ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0,033 (+/-0,074)
15	0,149 (+/-0,206)	0,149 (+/-0,206)	0,132 (+/-0,205)	0,331 (+/-0,324)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 24- Densidade de comprimento do folículo piloso ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0,033 (+/-0,074)
15	0,033 (+/-0,054)	0,149 (+/-0,206)	0,124 (+/-0,234)	0,132 (+/-0,205)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 25- Densidade de volume da glândula sebácea (%).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0,008 (+/-0,015)
15	0,0005 (+/-0,001)	0,006 (+/-0,008)	0,150 (+/-0,033)	0,005 (+/-0,009)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 26- Densidade de perfil da área da glândula sebácea ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0,0007 (+/-0,0001)	0,0007 (+/-0,001)
15	0	0,0006 (+/-0,0006)	0,0006 (+/-0,001)	0,00007 (+/-0,0001)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 27- Densidade de volume do músculo erector do pelo (%).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	0	0,002 (+/-0,004)	0,0005 (+/-0,001)	0,002 (+/-0,006)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 28- Densidade de superfície do músculo eretor do pelo ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	0	0,033 (+/-0,074)	0,008 (+/-0,018)	0,033 (+/-0,074)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 29- Densidade de perfil da área do músculo eretor do pelo ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	0	0,00007 (+/-0,0001)	0,00007 (+/-0,0001)	0,0002 (+/-0,0003)

Fonte: AUTOR, 2016.

**Tabela 30- Densidade de comprimento do músculo eretor do pelo ( $1/\mu\text{m}^2$ ).**

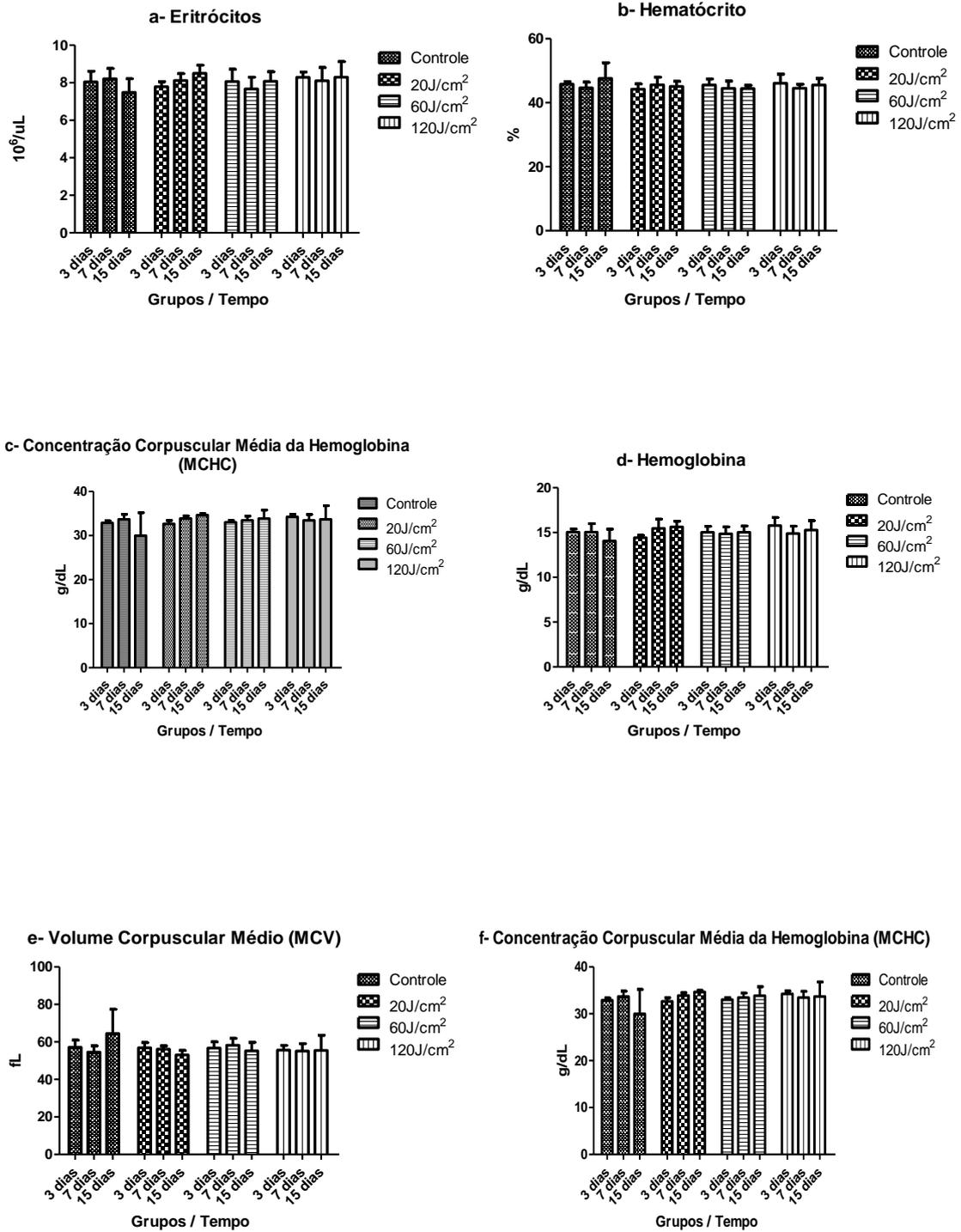
Grupo Dias	A Controle	B 20J/cm <sup>2</sup>	C 60J/cm <sup>2</sup>	D 120J/cm <sup>2</sup>
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	0	0,0001(+/-0,0003)	0,0001(+/-0,0001)	0,0004(+/-0,0006)

Fonte: AUTOR, 2016.

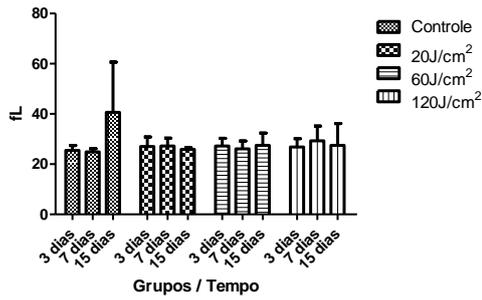
**Apêndice C - Gráficos de resultados para variáveis complementares**

**Gráficos 6 a-v - Exames hematológicos de hemograma e bioquímico.**

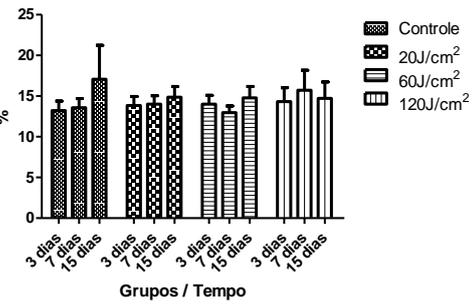
Fonte: AUTOR, 2016.



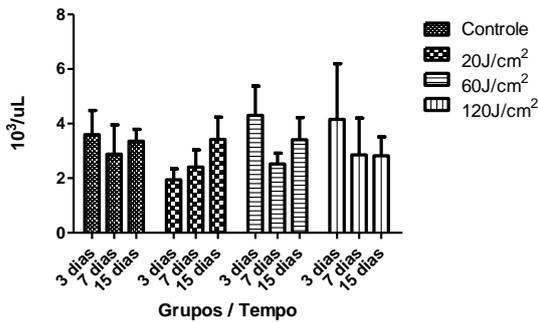
**g- Amplitude de Distância dos Eritrócitos (RDW-SD)**



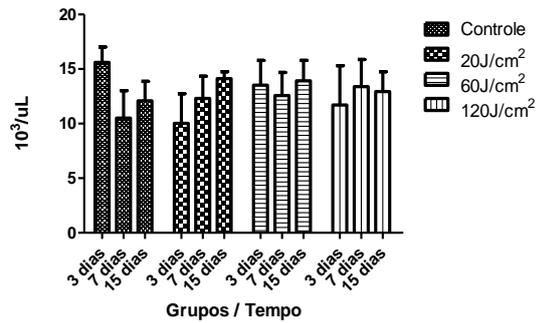
**h- Amplitude de Distribuição de Eritrócitos (RDW-CV)**



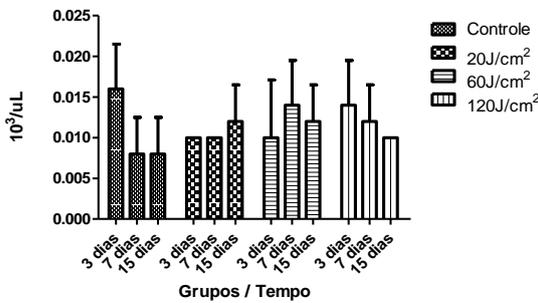
**i- Neutrófilo**



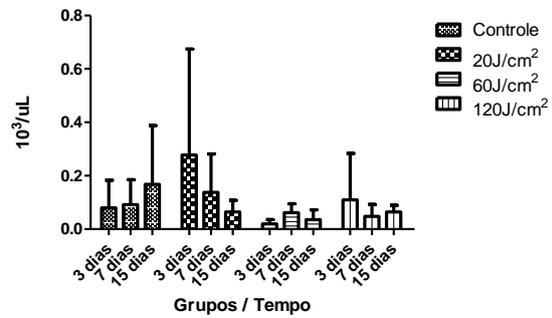
**j- Leucócitos**



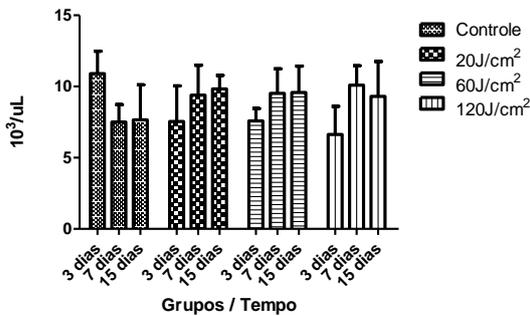
**k- Basófilo**



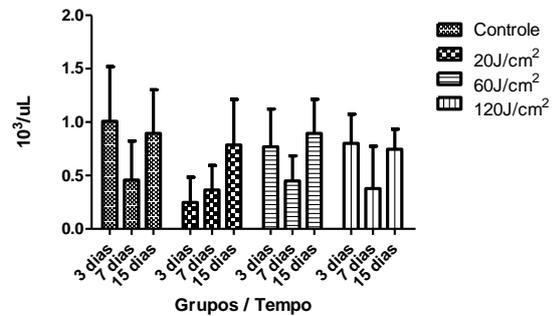
**l- Eosinófilo**



**m- Linfócitos**



**n- Monócito**



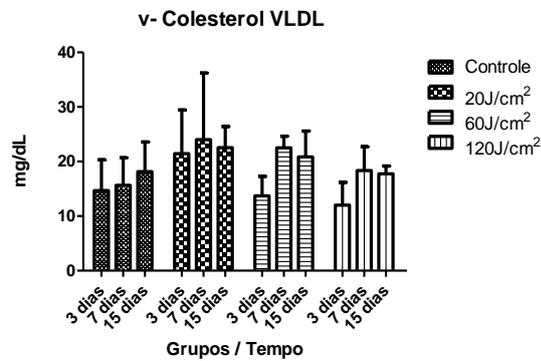
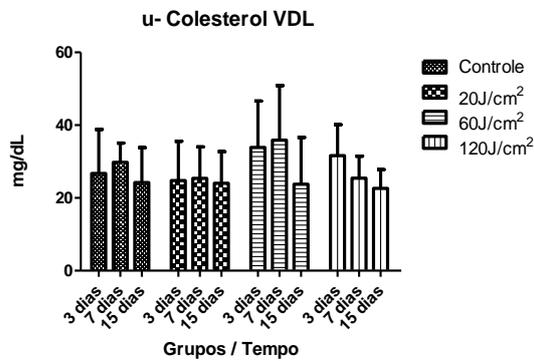
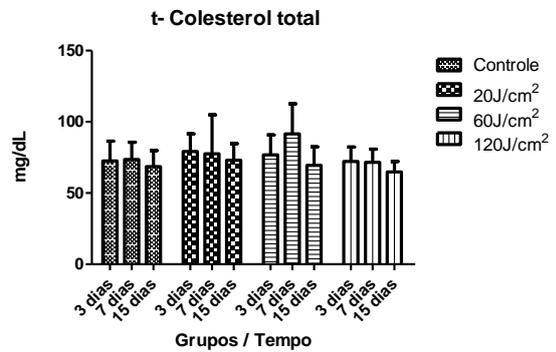
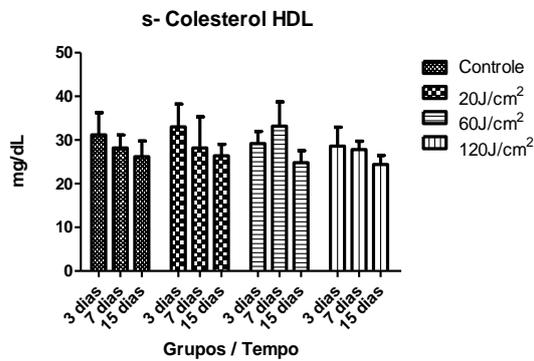
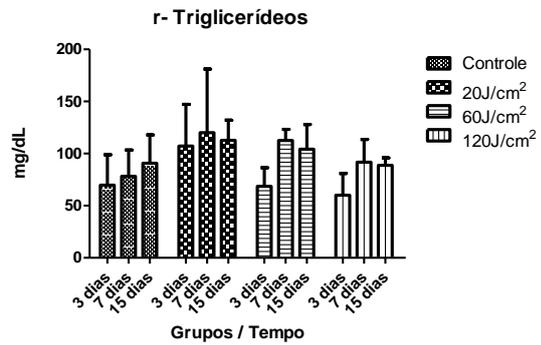
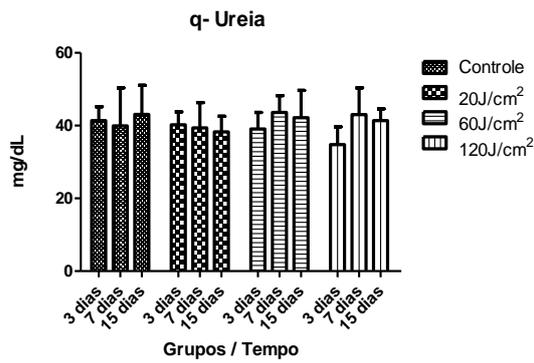
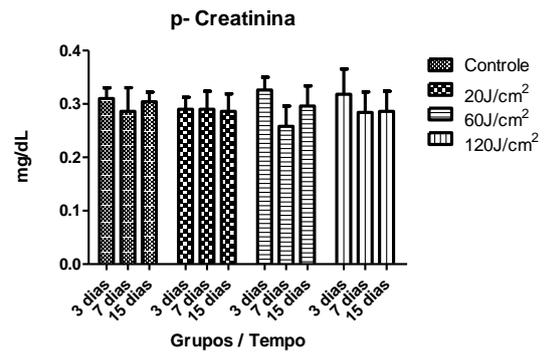
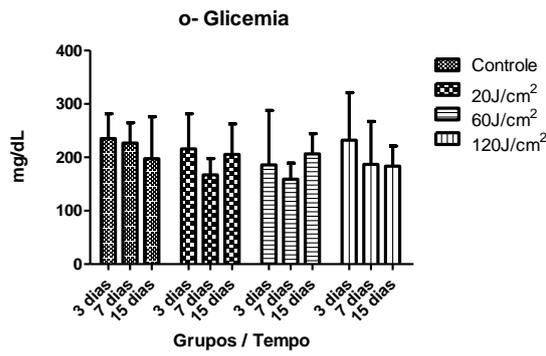
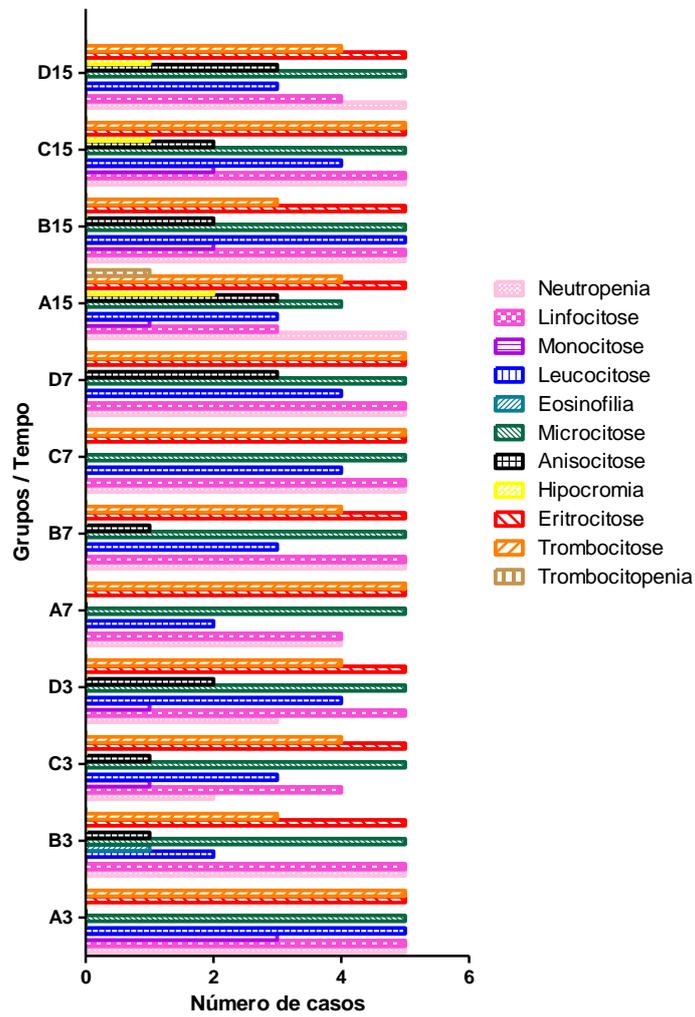


Gráfico 7- Resultados do Hemograma.



Qui-quadrado mostrou  $p > 0,05$ . Fonte: AUTOR, 2016.

## ANEXOS A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS - UNCISAL  
 Transformada pela lei nº 6.660 de 28 de dezembro de 2005  
 Campus Governador Lamenha Filho  
 Rua Jorge de Lima 113, Trapiço de Barra,  
 Cep 57.010.300 - Maceió-AL.

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNCISAL

Maceió, 18 de dezembro de 2013

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROCOLO Nº 103-A

TEMA: "Proposta de padronização da carga energética em terapia de feridas cutâneas com LASER vermelho e infravermelho de baixa potência. (Estudo experimental em ratos wistar)"

PESQUISADOR PRINCIPAL: Célio Fernando de Sousa Rodrigues

DATA DE ENTRADA NO CEP/UNCISAL: 31/10/2013

Sr<sup>(a)</sup>. Pesquisador<sup>(a)</sup>,

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 18/12/2013 foi de consenso a APROVAÇÃO do protocolo nº 103-A intitulado: "Proposta de padronização da carga energética em terapia de feridas cutâneas com LASER vermelho e infravermelho de baixa potência. (Estudo experimental em ratos wistar)", podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,

Graciliano Ramos Alencar do Nascimento  
 Coordenador do CEP/UNCISAL