

REGGIANI VILELA GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DO LASER ARSENETO DE GÁLIO E ARSENETO DE
GÁLIO – ALUMÍNIO E POMADA CICATRIZANTE EM FERIDAS
CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós - graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

REGGIANI VILELA GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DO LASER ARSENETO DE GÁLIO E ARSENETO DE
GÁLIO – ALUMÍNIO E POMADA CICATRIZANTE EM FERIDAS
CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós - graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 4 de outubro de 2006.

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Co-orientador)

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof. Gustavo Pereira Benevides

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo

Prof. José Mário da Silveira Mezêncio
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado o dom da vida e pela presença constante durante todo o meu percurso.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de ter realizado o curso.

Aos meus pais por todo apoio e confiança, essa vitória também é de vocês que sempre estimularam a realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão Emerson pela paciência e pela ajuda durante todo o trabalho e ao meu irmão Wadson pela amizade.

A minha querida vovó Maria Capistano Vilela que mesmo longe sempre torceu pelo meu sucesso.

Ao professor José Mário da Silveira Mezêncio pela amizade e companherismo, pela orientação e acompanhamento do trabalho e pela confiança depositada em mim.

Aos co-orientadores e amigos Sérgio da Matta e Clóvis Andrade Neves pelo acompanhamento, conselhos e pela competência auxiliada à paciência e bom humor.

Ao Professor Marcus Vinícius de Mello Pinto pela concessão dos aparelhos.

Ao professor José Lino Netto pela paciência e fundamental ajuda neste trabalho.

Ao professor Elpídio que gentilmente cedeu o programa para que as análises deste trabalho fossem feitas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos colegas de turma pelas grandes oportunidades de descontração e amizade, em especial as amigas Cláudia, Rejane , Sirlene, Edson, Bruna e Max pela ajuda no laboratório, pelas saídas, viagens, conversas e pelos bons momentos vividos.

A querida Mariáurea por todos os momentos de dificuldades que juntas conseguimos superar.

A todos os amigos: Frederico, Edmilson, Fabiana, Michele, Ronney, Gláucia, Gisele, Luíz, Jane, Fabiano, Marcelo, Marcos, Aline, Maria Inês, Dinha, Patrícia Rosemary, Alex, Lamara, Nádia, Tatiana e todos os demais colegas da Biologia Celular e Estrutural que indiretamente contribuíram para esta conquista.

As estagiárias Franciane, Alice e Alvarina pela dedicação e cumplicidade.

Ao amigo Francisco que com paciência me auxiliou nas análises estatísticas.

Aos funcionários: Diana, Salvador, Chiquinho, Jorge, Adão, Cassiano, Monteiro, pelo apoio.

Aos demais professores do Programa de Biologia Celular e Estrutural pelos conhecimentos fornecidos.

À todas as pessoas mencionadas por fazerem parte da minha vida..... da minha formação....., da minha história. Obrigada.....

BIOGRAFIA

REGGIANI VILELA GONÇALVES, filha de Devair Rezende Vilela e Cleuza Gonçalves Ferreira Vilela, nascida em 14 de novembro de 1979, na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Caratinga em dezembro de 2003, especialista em Ortopedia e Esportes pela Universidade Federal de Minas Gerais em 2004 .

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Pagina
SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Cicatrização.....	3
2.2. Efeitos fisiológicos do laser arseneto de gálio e do laser arseneto de gálio e alumínio.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Procedimentos para execução das feridas.....	14
3.3. Delineamento Experimental.....	17
3.4. Análise estatística.....	17

4.	RESULTADOS.....	19
5.	DISCUSSÃO.....	29
6.	CONCLUSÕES.....	33
7.	REFERÊNCIAS.....	35
8.	ANEXO :	
	Tabela 1.....	41
	Tabela 2.....	41
	Tabela 3.....	41
	Tabela 4.....	42
	Tabela 5.....	42
	Tabela 6.....	42
	Tabela 7.....	43
	Tabela 8.....	43

SIGLAS

EGF - fator de crescimento epitelial

ECAM - molécula de adesão célula-epitelial

FGF - fator de crescimento fibroblástico

FGF- β - fator de crescimento fibroblástico-beta

HE- hematoxilina - eosina

IL-1- interleucina 1

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- β - fator transformante de crescimento-beta

TNF - fator de necrose tumoral

Laser GaAsAl - laser arseneto de gálio - alumínio

Laser GaAs - laser arseneto de gálio

ANOVA - análise de variância para medidas repetidas

RESUMO

GONÇALVES, Reggiani Vilela, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2006.
Influência do laser arseneto de gálio e arseneto de gálio – alumínio e pomada cicatrizante em feridas cutâneas de ratos Wistar. Orientador: José Mário da Silveira Mezêncio. Co-Orientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta, Clóvis Andrade Neves.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito cicatrizante do laser arseneto de gálio - alumínio (GaAsAl) 830nm ($30\text{J}/\text{cm}^2$) ($60\text{J}/\text{cm}^2$) e do laser arseneto de gálio (GaAs) 904nm ($4\text{J}/\text{cm}^2$), comparando com a pomada Dersani[®]. Os parâmetros analisados foram a quantidade de fibras colágenas tipo I e III e a área de contração da ferida nos diferentes tratamentos. Foram analisadas também as influências dos diferentes tratamentos sobre o peso e os valores hematológicos dos animais. Foram utilizados 30 ratos Wistar adultos jovens, machos, com peso médio de 324g, separados em cinco grupos, cada grupo com seis animais. Os animais do grupo 1 foram tratados com o laser GaAs ($4\text{J}/\text{cm}^2$), os animais do grupo 2 tratados com o laser GaAsAl ($30\text{J}/\text{cm}^2$), no grupo 3 os animais receberam radiação do laser GaAsAl ($60\text{J}/\text{cm}^2$), no grupo 4 os animais receberam o tratamento tópico com a pomada Dersani[®] e no grupo 5 os animais tiveram as feridas tratadas com salina. Cada animal teve o dorso depilado e foram feitas cinco feridas padronizadas, marcando-se previamente a área e removendo-se a pele. O material para análise histológica foi corado com picrossírius, fotografados e as fotos analisadas no programa Quantum, baseado nas cores primárias (vermelho, verde, azul). Foi observada uma diferença estatística significativa do peso dos animais em relação aos diferentes tratamentos e o tempo do experimento. Considerando a área da ferida, os melhores resultados para o fechamento da ferida foram obtidos dos grupos tratados com o laser GaAs ($4\text{J}/\text{cm}^2$) e GaAsAl ($60\text{J}/\text{cm}^2$). A contagem global de leucócitos nos diferentes tratamentos não apresentou diferença significativa, exceto nos animais tratados com o Dersani[®] onde houve aumento significativo no número de monócitos. Os tratamentos com

salina e o laser GaAsAl 30J/cm² apresentaram aumento no número de neutrófilos. O maior número de fibras colágenas do tipo III foi observado nos animais irradiados com o laser GaAsAl 30J/cm². Em relação às fibras de colágeno do tipo I, os diferentes tratamentos não apresentaram um aumento significativo. Foi observado então que o laser GaAsAl 30J/cm² foi efetivo na produção de fibras colágenas tipo III e no processo cicatricial e que o laser GaAs (4J/cm²) foi efetivo para promover o fechamento da área da ferida.

ABSTRACT

GONÇALVES, Reggiani Vilela, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, October of 2006.
Influence of the gallium arsenide laser and gallium aluminum arsenide laser and healing ointment in the cutaneous wounds in Wistar rats. Adviser: José Mário da Silveira Mezêncio. Co-Advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta and Clóvis Andrade Neves.

The present work had as objective evaluates the healing effect of the gallium aluminum arsenide (GaAsAl) 830nm (30J/cm²) (60J/cm²) laser and gallium arsenide (GaAs) 904nm (4J/cm²) laser, comparing with the Dersani[®] ointment. The analyzed parameters were the amount of type I and III collagen fibers, and the area of contraction of the wound in the different treatments. They were also analyzed the influence of the different treatments on the weight and the hematologic values of the animals. They were used 30 Wistar rats, young adults, males, with medium weight of 324g, separate in five groups, each group with six animals. The animals of the group 1 were treated with GaAs (4J/cm²) laser, the animals of the group 2 treated with the GaAsAl (30J/cm²) laser, in the group 3 the animals received radiation of the GaAsAl (60J/cm²) laser, in the group 4 the animals received the topical treatment with the Dersani[®] ointment and in the group 5 the animals had the wound treated with saline. Each animal had the back waxed and were made five standardized wounds, previously marking the area and removing the skin. The material for histological analyze was dyed with picosirius, photographed and the pictures analyzed in the program Quantum, based on the primary colors (Red, Green, Blue). It was observed a significant statistical difference of the weigth of the animals in relation to the different treatments and the time of the experiment. Considering the area of the wound, the best results for the closing of the wound were obtained of the groups

treated with the GaAs (4J/cm²) laser and GaAsAl (60J/cm²) laser. The leukocyte global count in the different treatment didn't present significant difference, except in the animals treated with Dersani[®] where there was significant increase in the number of monocytes. The treatments with saline and GaAsAl (30J/cm²) laser presented increase in the number of neutrophils. The larger number of type III collagen fibers was observed in the animals irradiated with the GaAsAl (30J/cm²) laser. In relationship to the type I collagen fibers, the different treatments didn't present a significant increase. It was observed then that the GaAsAl (30J/cm²) laser was effective in the production of type III collagen fibers and in the cicatricial process and that the GaAs (4J/cm²) laser it went effective to promote the closing of the area of the wound.

1. INTRODUÇÃO

A pele constitui importante barreira que dificulta a invasão do organismo por patógenos, sendo a manutenção de sua integridade de fundamental importância. Nosso organismo é frequentemente agredido, e sendo a pele a região mais periférica e superficial é frequentemente lesada. Cicatrização são os eventos pelos quais o organismo tende a reparar uma área lesada e ocorre de forma sistêmica e dinâmica buscando restaurar a continuidade dos tecidos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O colágeno constitui uma família de proteínas que exercem principalmente funções estruturais, são produzidas por diferentes tipos de células e se distinguem pela sua composição química, características morfológicas, distribuição e função, sendo que atualmente são descritos mais de 20 tipos diferentes de colágeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

De acordo com CUZZEL & KRASNER (2003), são utilizados aproximadamente 2.500 procedimentos para o tratamento de feridas agudas e crônicas, que vão desde atitudes simples como o uso de emplastos e anti-sepsia, a curativos mais complexos com uso de tecnologias que demandam aparelhos caros, como algumas modalidades de laser.

Alguns procedimentos fisioterápicos utilizados no tratamento de feridas atuam no processo cicatricial de várias formas sendo uma das técnicas mais utilizadas é a radiação com laser. Na terapia com laser podem ocorrer estímulos de mecanismos biológicos e regenerativos e a maioria dos efeitos registrados dizem respeito à proliferação de células, principalmente fibroblastos (SAY et al., 2002). Porém, segundo este mesmo autor a proliferação de fibroblastos não é o único meio pelo qual a laserterapia pode acelerar o processo cicatricial, verifica-se também que o laser promove a transformação de fibroblastos em miofibroblastos. Os miofibroblastos são células diretamente envolvidas na contração do tecido de granulação (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As pomadas cicatrizantes também são recursos amplamente utilizados no Brasil, entre elas destaca-se a Dersani[®] que é derivada do ácido linoléico, essa pomada atua em todas as fases de cicatrização acelerando o processo (MALDEBAUM., et al, 2003).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do laser GaAs ($4\text{J}/\text{cm}^2$) e do laser GaAsAl ($30\text{J}/\text{cm}^2$) ($60\text{J}/\text{cm}^2$) e da pomada cicatrizante Dersani[®] no processo cicatricial da pele de ratos Wistar e na produção de fibras colágenas tipo I e III . Este trabalho também teve como objetivo avaliar qual tratamento é mais efetivo para promover a cicatrização de feridas e avaliar a relação do processo cicatricial com a produção de algumas células sanguíneas.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cicatrização

A cicatrização é um processo dinâmico que envolve fenômenos fisiológicos que se comportam de forma harmônica a fim de garantir a restauração tissular. Inicialmente, deve ocorrer perda tecidual, a partir da qual os fenômenos fisiológicos voltam-se para o reparo da lesão (CLARK, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes hospitalizados e 20% dos pacientes acamados tratados em casa, sofrem ulcerações na pele acarretando grandes gastos. Nos Estados Unidos da América os gastos com feridas crônicas chegam a um bilhão de dólares por ano (KOROLKOVAS & BUARCKHALTER, 1985). Embora não haja dados precisos no Brasil, alguns trabalhos demonstram que os impactos psíquicos, sociais e econômicos da cronificação de lesões na pele representam a segunda causa de afastamentos de trabalho (NORMAM & BOCK, 2003).

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo, em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A pele é o maior órgão do corpo humano, representando 16% do peso corporal e desempenha múltiplas funções como, proteção do organismo contra perda de água e lesões ocasionadas pelo atrito, função homeostática,

constituindo-se importante barreira física contra a invasão do nosso organismo por patógenos, funcionando como barreira imunológica (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Através de suas terminações nervosas sensitivas, recebe informações do meio ambiente que são enviadas para o sistema nervoso central e também colabora na termorregulação. A pele pode ser classificada em dois tipos: Espessa que recobre a palma das mãos e sola dos pés, possuindo epiderme grossa, e delgada que reveste o restante do corpo e possui epiderme fina (KIERSZENBAUM, 2004).

Se uma porção da epiderme sofre lesão ou é destruída, as células basais ao redor migram e proliferam para revestir a área exposta. Este processo de reparo ocorre sob a influência da membrana basal, da matriz extracelular do tecido conjuntivo da derme e de uma variedade de hormônios e fatores de crescimento (KIERSZENBAUM, 2004). Durante a renovação das células da epiderme existem pontos que devem ser regulados, como por exemplo, a taxa de divisão das células tronco e o momento da saída da camada basal, dentre outros (ALBERTS et al., 2004).

A derme é o tecido conjuntivo onde se apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. Apresenta espessura variável de acordo com a região observada e é constituída por duas camadas de limites pouco distintos: a papilar, que é a camada superficial e a reticular, mais profunda. Do ponto de vista estrutural, os componentes do tecido conjuntivo podem ser divididos em 3 constituintes: células, fibras e substância fundamental. Entre os constituintes, destaca-se a matriz extracelular que consiste em diferentes combinações de proteínas fibrosas, não fibrosas e de substância fundamental (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A matriz extracelular tem papel importante no processo de cicatrização, pois forma a matriz provisória para a agregação plaquetária e coagulação sanguínea. A liberação de fatores de crescimento e proteínas de adesão estimula a resposta inflamatória e induz a migração celular para o interior da cicatriz usando a matriz provisória como substrato (MANWARING, 2004).

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo, estão espalhados no tecido conjuntivo de todo o corpo e secretam matriz extracelular que é rica em colágeno I e III. Quando um tecido é lesado, os fibroblastos próximos proliferam, migram para a ferida e produzem grandes quantidades de matriz rica em colágeno, que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado. Os fibroblastos da pele são diferentes dos encontrados em outras partes do corpo, pois não apresentam a mesma plasticidade e também podem ser induzidos a modificar suas características. Por exemplo, na cicatrização da ferida os fibroblastos da pele alteram sua expressão do gene de actina e adquirem algumas propriedades contráteis das células musculares lisas, aproximando as margens

do ferimento, passando a ser chamados de miofibroblastos (BADYLACK, 2002; ALBERTS et al., 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O colágeno é o tipo mais abundante de proteína do organismo, cuja família é composta por mais de vinte tipos diferentes de proteínas citando-se o colágeno que formam fibrilas tipo I e tipo III. Existem também os colágenos associados a fibrilas e o colágeno que forma redes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Um outro importante componente da matriz extracelular é a fibronectina, que existe na forma solúvel e possui várias propriedades para o reparo tecidual incluindo ligantes para células, colágeno e glicosaminoglicanos. Interações nestes sítios intermedeiam e mantêm normais as migrações e adesões celulares (BADYLACK, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Na matriz encontramos também laminina que é um complexo de adesão de proteínas que tem papel importante na formação e manutenção da estrutura vascular durante o reparo tecidual. Os glicosaminoglicanos têm papel importante na ligação de fatores de crescimento, de citocinas, na retenção de água e nas propriedades de gel da matriz extracelular. Ligam-se a heparina muitos fatores de crescimento e receptores presentes na superfície das células, isso faz com que os glicosaminoglicanos ricos em heparina sejam extremamente desejáveis para o reparo tecidual (BADYLACK, 2002).

Segundo BRASILEIRO FILHO (2004), a cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. O primeiro passo é a instalação de uma reação inflamatória cujo exsudato de células fagocitárias reabsorve o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. Em seguida, ocorre proliferação fibroblástica e endotelial que dá origem ao tecido conjuntivo cicatricial. Para CARVALHO (2002), tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local começam muito cedo no processo da inflamação e no final resultam em reparo e substituição das células mortas por células saudáveis.

Entre os dois tipos de cicatrização existentes, a cicatrização por primeira intenção é mais rápida e leva a formação de cicatrizes menores, sendo a fenda da ferida mais estreita e a destruição tecidual nas bordas menor. Na cicatrização por segunda intenção a ferida é extensa e tem margens afastadas, forma-se um grande coágulo e se ocorre infecção associada, a reação inflamatória é exagerada. Em ambas, a exsudação de fagócitos é intensa e forma-se abundante tecido de granulação. Quando as bordas da ferida são distantes, a regeneração da epiderme fica mais lenta, as células da epiderme proliferam nas margens, ocorrendo certo grau de hiperplasia, devido a

grande quantidade de fatores de crescimento liberados a partir das células exsudadas. Nesta ferida o fenômeno de retração feito pelos miofibroblastos é muito mais evidente, sendo mais freqüente a transformação de fibroblastos em miofibroblastos. Os macrófagos e monócitos liberam IL-1 e TNF α que estimulam as células endoteliais das vênulas vizinhas a exporem as moléculas de adesão para os fagócitos (ECAM), o coágulo então é invadido por polimorfonucleares (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Com a evolução do processo o número de polimorfonucleares diminui sensivelmente e o exsudato passa a ter predomínio de macrófagos, eles induzem angiogênese, participam da conclusão da inflamação, secretam citocinas e fatores de crescimento, que vão ter ação parácrina para ativar outras células envolvidas no processo cicatricial (PARK & BARBUL, 2004). As células da camada basal da epiderme entram em mitoses e migram sobre a superfície do coágulo. Os fibroblastos do tecido conjuntivo tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo e começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular. As células endoteliais começam a sintetizar a membrana basal e o broto se organiza formando um novo capilar. Vai se formando uma rede capilar que acompanha a nova matriz que está sendo formada pelos fibroblastos. Desse modo forma-se um tecido conjuntivo vascularizado preenchendo o espaço antes ocupado pelo coágulo. Esse tecido conjuntivo frouxo que é rico em capilares sanguíneos, leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanos, recebem o nome de tecido de granulação. A quantidade de colágeno tipo I aumenta com o tempo e o tecido de granulação vai progressivamente sendo substituído por um tecido mais denso e menos vascularizado (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização. Alguns autores classificam a cicatrização em 3 fases: 1º) inflamação; 2º) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e 3º) remodelação tecidual (CLARK, 1993; BRASILEIRO FILHO, 2004). O termo granulação deve-se ao seu aspecto róseo e granular na superfície das feridas, mas o mais característico são seus aspectos histológicos: proliferação de pequenos vasos sanguíneos neoformados e de fibroblastos, os chamados granulócitos (SCHOEN et al., 1996).

Segundo MALDEBAUM et al. (2003), a cicatrização pode ser dividida em 5 fases principais: 1º) coagulação, que depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, caracteriza-se pela liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e

proteases que vão ser importantes para as outras fases do processo; 2º) a inflamação, que é a resposta imediata e inicial a um agente agressor, compreendendo três componentes principais, alteração no calibre vascular, alterações estruturais na microvascularização e migração dos leucócitos da microcirculação; 3º) a proliferação pode ser dividida em 3 subclasses, a reepitelização, a fibroplasia e a angiogênese; 4º) contração da ferida que é o movimento centrípeto das bordas da ferida; 5º) remodelação que é a última fase, envolvendo o colágeno e a matriz, é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz. Uma cicatriz normal tem em torno de 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (MALDEBAUM et al., 2003; SCHOEN & COTRAN, 1996).

Além dos fibroblastos, existem outras células que participam ativamente do processo cicatricial. As células do sistema imune são muito importantes para a regulação do processo de cicatrização de feridas, através da secreção de moléculas de sinalização como citocinas, linfocinas e fatores de crescimento. Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a chegar ao local da lesão, tendo ação de fagocitose e diminuindo a probabilidade de infecção no processo cicatricial. A migração dos macrófagos ocorre em torno de 48 a 96 horas após a lesão e induzem angiogênese, participam do debridamento da ferida devido à produção de enzimas como colagenases e elastases, secretam citocinas e fatores de crescimento, que têm ação parácrina para ativar outras células envolvidas no processo (DANTAS & SIQUEIRA JÚNIOR, 2000).

As citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos provocam a adesão de leucócitos, a migração e a proliferação de células indiferenciadas, que começarão a repopular o sítio da lesão. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformante de crescimento β (TGF β), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), são sintetizados e liberados na matriz extracelular por macrófagos, linfócitos exsudatos e pelos fibroblastos (COLLINS, 2000; ZHANG et al., 2003).

A proliferação de uma célula animal, não depende apenas dos nutrientes que ela recebe, devendo receber também um sinal de estímulo extracelular na forma de mitógenos. Um dos primeiros mitógenos identificados foi o PDGF, que é liberado no sangue coagulado e tem a função de estimular a divisão celular, durante a cicatrização de feridas. O PDGF é somente uma das mais de 50 proteínas conhecidas por sua atuação como mitógenos, muitas dessas proteínas são fatores de especificidade ampla, como o PDGF e o EGF, podendo estimular muitos tipos de célula a se dividir (ALBERTS et al., 2004). A ativação de fibroblastos se faz por PDGF sintetizado por

macrófagos e plaquetas que induzem a divisão celular (G0 para G1) e expõem receptores para outros fatores de crescimento (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Segundo CHIN et al. (2004), TGF β compõem uma família de proteínas que tem atividade de citocina, atuando predominantemente em células epiteliais e tem importante papel na plasticidade cirúrgica. Estas proteínas regulam a replicação celular, diferenciação, formação óssea, angiogênese, hematopoiese, progressão do ciclo celular e migração celular, são importantes na cicatrização de feridas estimulando a síntese de colágeno, proteoglicanas, fibronectina e no caso de cicatrizes hipertróficas, regulam o desenvolvimento da derme e epiderme.

Os FGF's constituem uma família de fatores de crescimento que estão presentes na matriz, sendo responsáveis pela regulação da proliferação, diferenciação, migração e pela sobrevivência da célula (BYER, 2003), são liberados no local da ferida por macrófagos e células endoteliais que sofrem danos (MARTIN, 1997). Dentro desta família destaca-se o b-FGF que estimula a divisão e migração de fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais (TAKEHARA, 2000).

O EGF também é secretado pelos macrófagos, distribuem-se amplamente nas secreções e líquidos teciduais, como suor, saliva e conteúdo intestinal (COLLINS, 2000). O EGF é produzido na fase final da cicatrização de uma ferida, apresenta quimiotactismo positivo para fibroblastos, atraindo-os para a ferida e estimulando-os a se dividir e secretar fibras colágenas (CARVALHO, 2002).

A ação eficaz dos fibroblastos depende do suprimento local de oxigênio, sendo que tecidos mal vascularizados não apresentam boa cicatrização. A superfície da ferida possui baixo teor de oxigênio, influenciando assim os macrófagos a produzir e liberar TGF β e FGF, estimulando o processo de angiogênese (DEALEY, 2001). A baixa pressão de oxigênio na ferida é estímulo para a síntese de fatores de crescimento pelos macrófagos, embora a hipóxia seja prejudicial a vários processos fisiológicos normais, principalmente para a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Sem oxigênio a molécula helicoidal de procolágeno não se forma e nem é liberada no espaço extracelular (DANTAS & SIQUEIRA JÚNIOR, 2000).

A cicatrização é influenciada por fatores locais e sistêmicos que podem induzir, retardar ou impedir o processo cicatricial. A infecção ou presença de corpos estranhos retarda o processo cicatricial porque mantém a reação inflamatória. A desnutrição, especialmente de proteínas, vitamina C ou de zinco, retardam a cicatrização por interferir diretamente nos processos de síntese do colágeno. O zinco é um componente importante de metaloproteínas, inclusive as que participam

da síntese do DNA responsáveis pela degradação da matriz e pelo equilíbrio no processo cicatricial. A baixa perfusão tecidual, decorrente de lesões vasculares ou perturbações hemodinâmicas, dificulta a cicatrização por reduzir o fornecimento de nutrientes e oxigênio. Algumas patologias também retardam o processo de cicatrização, dentre elas destacamos o diabetes, pois ocorre glicosilação das proteínas, e a neutropenia, que prejudica a cicatrização devido a redução de estímulos, mediadores da inflamação liberados por terminações nervosas (SCHOEN & COTRAN, 1996; BRASILEIRO FILHO, 2004).

2.2. Efeitos fisiológicos do laser arseneto de gálio e do laser arseneto de gálio e alumínio

Apesar de grandes avanços verificados nas últimas décadas não só na compreensão dos diversos fatores e fenômenos envolvidos no processo de reparação tissular, e mesmo considerando o aumento crescente de pesquisas e descoberta de novos recursos tecnológicos utilizados na intervenção do processo cicatricial, a prevalência de feridas crônicas, ainda é elevada. Apesar dos dados brasileiros serem pouco precisos, alguns autores estimam que aproximadamente 3% da população brasileira é portadora desse tipo de lesão. No caso de pessoas diabéticas esta proporção se eleva para 10%, e cerca de quatro milhões de pessoas são portadoras de lesões crônicas ou têm algum tipo de complicação no processo cicatricial (MALDEBAUM et al., 2003).

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, já existem desde a antiguidade o que demonstra a importância de protegê-las de forma a evitar sua complicação. Entre os principais recursos disponíveis no Brasil para auxiliar a cicatrização de feridas estão os ácidos graxos essenciais dentre eles destacam-se os derivados do ácido linoléico. É nesse grupo que se encontra a pomada Dersani[®]. Essa pomada pode ser usada em todos os tipos de lesão, nos diversos estágios do processo cicatricial e como preventivo de lesões, atuando de forma bactericida em diversas fases do processo cicatricial. Tem ação também sobre a membrana celular, aumentando sua permeabilidade, facilitando a entrada de fatores de crescimento, promovendo mitose e proliferação celular, estimulando neoangiogênese e promovendo quimiotaxia para leucócitos (MALDEBAUM et al., 2003).

A fisioterapia atua como tratamento na recuperação de tecidos orgânicos lesados, utilizando vários métodos e técnicas que visam de modo geral melhorar o bem-estar físico, refletindo-se no estado psíquico do indivíduo (STADELERJ et al., 1999). Dentro dessas técnicas destaca-se o laser, que tem grande eficácia no processo cicatricial, recuperando o tecido por induzir diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, síntese de colágeno e epitelização (GUIRRO & GUIRRO, 2002).

Pesquisas envolvendo o princípio de ação do laser vêm sendo desenvolvidas desde o início do século, mas só em 1960, o primeiro laser foi empregado com sucesso (GUIRRO & GUIRRO, 2002). A laserterapia tem tido uma ampliação na sua utilização nas últimas três décadas, na Europa Ocidental e Rússia e nos últimos dez anos nos Estados Unidos e Canadá. Seu êxito se deve às respostas que induz nos tecidos, como redução do edema e diminuição do processo inflamatório (TROWBRIDGE & EMLING, 1993).

A palavra laser significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (Light Amplification by stimulated Emission of Radiation), fenômeno em que ocorre excitação dos elementos constituintes do material exposto à onda eletromagnética por corrente elétrica, proporcionando a emissão de fótons que amplificam a emissão de radiação (LANGE et al., 2003).

Segundo BROMILEY (1993), os raios lasers produzem luz monocromática, a luz emitida é de mesmo comprimento de onda e de frequência, pois tem uma só cor que difere em cada categoria de laser, existe uma variação no comportamento de fótons que não divergem. Ao contrário da luz doméstica que se espalha depois de sair da fonte, a luz monocromática produz intensidade capaz de criar uma força de radiação por cm^2 muito grande, uma vez que os fótons chegam ao ponto final com igual carga de energia luminosa.

O uso de tratamento térmico como modalidade terapêutica tem sido aplicado há muitos anos para esterilização de feridas e controle de sangramento (BROWN, 2000). O laser arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) é denominado laser terapêutico, pois graças à sua baixa potência, a carga fotônica é insuficiente para produzir efeito térmico (BROMILEY, 1993).

Das múltiplas aplicações do laser em medicina, pode-se tirar proveito dos seus efeitos fisioterápicos, baseando-se em sua ação vasodilatadora pré-capilar e capilar. Tais efeitos melhoram a circulação sanguínea, aumentam a oxigenação dos tecidos, o aporte de nutrientes e a retirada de catábolitos e promovem modificações na pressão hidrostática, favorecendo a reabsorção de edemas. Além disso, inibem a síntese de prostaglandinas, elevam o limiar de dor, estimulam a

produção de endorfinas e atuam positivamente sob a regeneração tecidual pela elevação do metabolismo (CRUAÑES, 1984; HARRIS, 1991).

Desde que os lasers foram considerados bioestimuladores, passaram a ser utilizados experimentalmente e clinicamente para estimular a cicatrização de feridas abertas e cirúrgicas (VASCONCELOS et al., 1984; SEITZ & KLEINKORT, 1986; CALDEIRA, 1997; MIKAIL, 1997), na cicatrização óssea (SEITZ E KLEINKORT, 1986; MIKAIL, 1997), nos processos inflamatórios (MIKAIL, 1997) e nas compressões nervosas (BROMILEY, 1993; SCHIMITT et al., 1993).

O comprimento de onda e a densidade de energia são fatores preponderantes para o sucesso da terapia no que se refere à cicatrização (BREUGEL, 1993). Para avaliar o efeito dos raios laser sob feridas deve-se levar em consideração, sexo, idade, história pessoal, antecedentes familiares, tipo, tamanho e localização anatômica da ferida, tratamentos anteriores realizados, medicamentos usados, presença de dor, entre outros (BREUGEL, 1993).

Quanto maior o comprimento de onda maior a penetração do laser nos tecidos (HARRIS, 1991). A penetração do laser He-Ne é de 10 a 15mm (SEITZ & KEINKORT, 1986), enquanto que o laser AsGa está em torno de 50mm (SEITZ & KLEINKORT, 1986; CALDEIRA, 1997). O laser de AsGa produz luz invisível que não é absorvida pelos pigmentos celulares, com penetração tissular entre 10 e 50mm. Segundo TAYLOR et al., (1998) esta penetração é de 5mm e segundo CRUAÑES (1984); BROMILEY (1993) é de 10 e 15mm nos tecidos moles. Os efeitos fisiológicos da bioestimulação incluem aceleração na síntese de colágeno (CRUAÑES, 1984; HARRIS, 1991; TAYLOR et al., 1998) e diminuição local do número de microorganismos (SEITZ & KLEINKORT, 1986).

O laser quando aplicado em doses corretas estimula a taxa de crescimento do ciclo celular, provavelmente isso ocorre devido ao aumento na vascularização e no estímulo da capacidade fibroblástica, causando uma aceleração do ritmo mitótico quando comparado às células não submetidas ao tratamento com laser (MANZANARES et al., 1990).

A ação analgésica ocorre por normalização e favorecimento da produção de peptídeos endógenos e por modificação nas interferências elétricas celulares, interrompendo a propagação da dor (RITSON, 1993; PUETT & GRIFFIN, 1994; KOSACHENCO et al., 1995). Ainda não é bem entendida qual a modalidade de laser poderia obter os melhores resultados para feridas crônicas,

apenas sabe-se que o controle da dosagem e a duração da irradiação são essenciais para um bom resultado (SAY et al., 2002).

Segundo PARREAU-SCHEIDE et al. (1990) e ROIG et al. (1990), a irradiação com o laser HeNe estimula as culturas de linfócitos, aumentando sua capacidade de fagocitose, aumentando a eficiência das células apresentadoras de antígeno, e assim promovendo um aumento na afinidade dos linfócitos para detectar o patógeno invasor. O laser promove uma melhor oxigenação e vascularização do tecido porque atua no esfíncter pré-capilar, gerando a abertura constante e aumentando a capacidade de cicatrização do tecido (SERAFIM & TEODOROSKI, 2003).

Vários são os mecanismos pelos quais o laser pode atuar na promoção da cicatrização tecidual. Segundo IHSAN (2005), o laser de baixa potência, aumenta a oxigenação tecidual, promovendo a expansão da microcirculação e estimulando a capacidade adaptativa. O laser GaAIs 904 nm, quando aplicado na microcirculação mesentérica de ratos vivos, promove dilatação das arteríolas irradiadas, seguida de aumento no fluxo sanguíneo arteriolar. Segundo ENWEMEKA et al., (2004), as três fases do reparo tecidual são positivamente afetados pelo tratamento com o laser, o efeito positivo está em aspectos conhecidos da inflamação tais como proliferação celular, degranulação e promoção de atividades de citocinas.

Os resultados dos estudos de REDDY (2003), indicam que o laser GaAs é efetivo na promoção do reparo e na melhora da cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Os resultados revelaram que o colágeno total foi aumentado em 19% nas feridas tratadas com o laser He-Ne e 14% nas feridas tratadas com o laser GaAs. Os achados das análises biomecânicas e bioquímicas de feridas de ratos diabéticos demonstram que o laser He-Ne é superior ao laser GaAs na promoção do reparo das feridas. A radiação produzida pelo laser He-Ne foi a mais estudada entre as várias intensidades de laser para promover a cicatrização de feridas, já o efeito do laser GaAs no processo cicatricial permanece pouco entendido (MENDEZ et al., 2004).

As diferenças entre o laser He-Ne e GaAs podem ser atribuídas à sua interação fotoquímica com as células. Evidências sugerem que a absorção de luz emitida pelo laser He-Ne é de 632,8 nm, essa absorção inicia com um componente da cadeia respiratória, já na radiação emitida pelo laser GaAs de 904nm, a absorção inicia à nível de membrana mitocondrial, que é, durante a cascata de eventos moleculares e leva a resposta fotoquímica para o tecido. A transferência de elétrons dos complexos ATP sintetase é associada com a diminuição da energia livre, a qual é usada como bomba de prótons da matriz para o espaço intermembrana, produzindo um gradiente de prótons

através da membrana interna. A energia estocada com o gradiente de prótons é usada para dirigir a síntese de ATP, com os prótons fluindo de volta para a matriz pelo complexo ATP sintetase (REDDY, 2003).

A laserterapia deve ser realizada após a preparação e demarcação da área a ser tratada, através de uma caneta de forma pontual ou em varredura, podendo ser realizadas sessões diárias ou em intervalos de 2 a 4 dias. A área a ser tratada deve ser dividida em cm^2 e o raio deve incidir por 15 a 30 segundos, diretos e perpendicularmente ao centro da área assim concebida. Além da forma pontual ou em varredura a aplicação da radiação pode se dar de forma centrípeta. (LAMAS, 1999).

Entre as contra-indicações do laser estão as aplicações em pacientes com neoplasias, mulheres gestantes e sobre placas epifisárias abertas. Dentre as precauções, evitar a incidência direta nos olhos do aplicador e do paciente os quais devem estar protegidos por óculos de segurança (CRUAÑES, 1984; SEITZ & KLEINKORT, 1986; LAMAS, 1999).

Considerando que a identificação de técnicas apropriadas que promovam o processo cicatricial representam benefícios importantes no cuidado com pacientes e diminuição imediata de custos, estudar o efeito cicatrizante das diferentes modalidades de laser e determinar sua ação sobre as fibras colágenas durante o processo cicatricial, é fundamental para estabelecer mecanismos que possam promover uma cicatrização mais rápida, segura e livre de infecções, reduzindo assim o tempo de cicatrização e recuperação, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e diminuindo os custos imediatos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus Morvegicus*), machos, com peso médio de 324,62g, dez semanas de vida, sadios, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Estes animais foram mantidos em condições naturais de luz, umidade e temperatura, em gaiolas individuais, diariamente higienizadas. Ao longo do experimento os animais foram alimentados uma vez por dia com ração comercial Labcil[®] e água fornecida à vontade, sendo mantidos no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Procedimento para execução das feridas

Os animais tiveram a região dorso-lateral depilado utilizando-se aparelho da marca WAHL Clipper Corporation[®]. O tamanho e a profundidade das feridas cirúrgicas foram padronizados e as mesmas foram feitas com bisturi, removendo-se cuidadosamente a pele, em áreas previamente marcadas com cristal violeta, como se observa na Figura 1. Este procedimento foi feito após a higienização do local, onde foram feitas as feridas utilizando salina, em seguida os animais foram

anestesiados por inalação de éter etílico, em câmara hermeticamente fechada. No primeiro dia do experimento, foram feitas cinco feridas cirúrgicas no dorso de cada animal, com diâmetro aproximado de 12mm, em uma profundidade que garantia que apenas a pele estava sendo retirada não incluindo outros tecidos como músculos. Foram coletados fragmentos de 4 em 4 dias, de feridas diferentes, estes fragmentos continham a borda e o centro da ferida para que pudesse ser feita comparação com o tecido não lesado. O fragmento coletado no primeiro dia, também era de tecido ileso, e a ordem de localização das lesões está apresentada na Figura 1, totalizando 20 dias contínuos de experimento. A quinta ferida foi medida de 4 em 4 dias usando paquímetro. Os animais dos grupos 1, 2 e 3, começaram a receber irradiação com o laser até 6 horas após se fazer a lesão e durante 20 dias ininterruptos repetiu-se o procedimento.

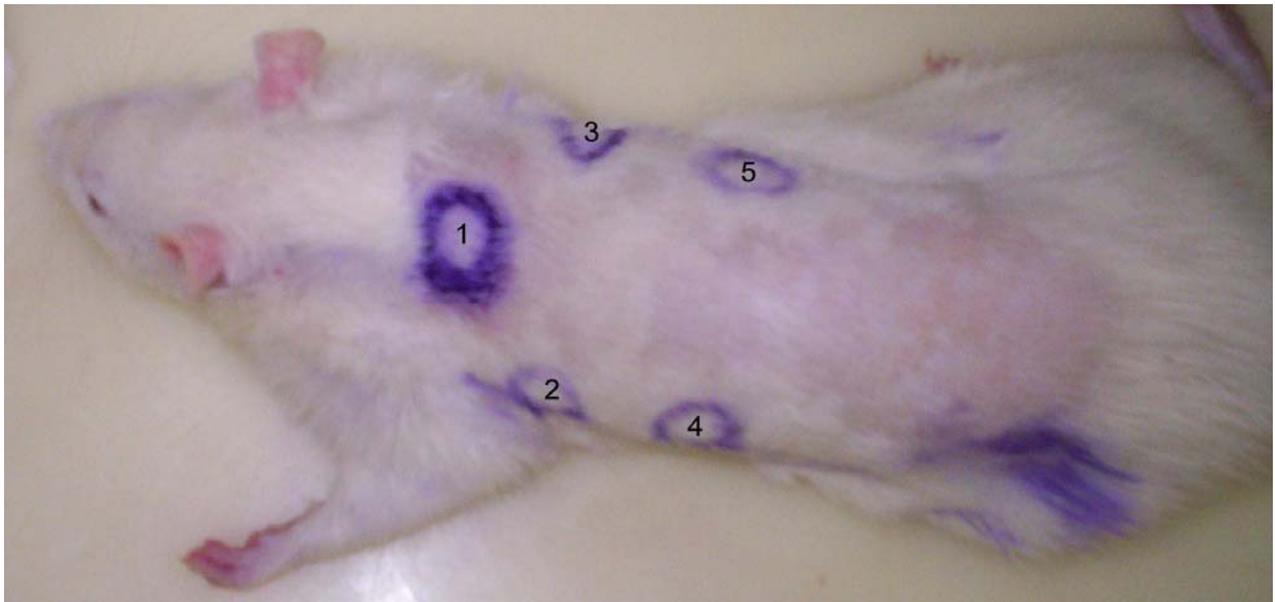


Figura 1 - Localização das feridas na região dorso-lateral de rato Wistar.

Foi coletado, sangue no primeiro e último dia do experimento, através de um corte no plexo venoso da cauda. O sangue foi armazenado com o anticoagulante, (ácido etilenodiamino tetraacético, EDTA). Logo após a coleta do sangue foi feito o hematócrito utilizando centrífuga capilar da marca Sigma. A contagem global de leucócitos foi feita utilizando câmera de Neubauer e o

esfregaço, que permitiu contagem diferencial dos mesmos, após a coloração com Giemsa, foi analisado em microscópio Olympus CX 40[®]. Os animais foram pesados a cada 4 dias, coincidindo com a retirada dos fragmentos das lesões.

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Os fragmentos retirados foram fixados em formaldeído 10% em tampão fosfato de sódio por 24 horas. O material foi processado para inclusão em parafina seguindo as seguintes etapas: desidratação em etanol (70%, 80%, 90% e 100%, sendo neste último três vezes), diafanização (xilol I, II, III), infiltração (parafina histológica I, II, III) e emblocamento. Foram obtidos cortes de 4µm em micrótomo rotativo (Reichert-jung 2045 Multicut[®], Germany) os quais foram corados com picosírius e hematoxilina e eosina. As lâminas contendo os fragmentos passaram por uma bateria de xilol (desparafinizar), bateria de álcool (hidratar), em seguida corado pelo sirius-red durante 1 hora, lavado em água destilada, corado com hematoxilina por 6 minutos, lavado em água corrente, desidratado, diafanizado e montado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Foram feitas imagens em microscópio de polarização e avaliadas a quantidade de fibras colágenas dos tipos I e III presentes antes e após o tratamento, a documentação fotográfica foi realizada no mesmo aparelho onde foram feitas as análises (Fotomicroscópio Olympus AX-70[®]), no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. A partir de cada amostra foram tiradas quatro fotos de diferentes regiões do campo. A análise foi feita usando o programa Quantum que diferencia as fibras pelas cores vermelho, verde e azul de cada uma delas, os parâmetros (intervalos) que definiram a identificação das cores vermelho, verde e preto foram previamente padronizados e depois utilizados em todas as fotografias obtidas, a cor vermelho representou as fibras colágenas do tipo I, o verde representou as fibras colágenas do tipo III, e o preto representou regiões onde não foram encontradas nenhum tipo de fibra, o programa fornecia a porcentagem de cada cor.

3.3. Delineamento experimental

Os animais foram separados aleatoriamente em 5 grupos, cada grupo com seis animais. Todos os grupos tiveram as feridas limpas com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% uma vez ao dia, pela manhã antes de receberem os diferentes tratamentos. O grupo 1 constituiu-se de animais que foram submetidos a radiação do laser arseneto de gálio (GaAs), comprimento de onda 904nm, fluência de radiação de $4\text{J}/\text{cm}^2$, utilizando a técnica de varredura, durante 20 dias, contínuos uma vez ao dia. O grupo 2 constituiu-se de animais submetidos a tratamento com o laser arseneto de gálio e alumínio (GaAsAl), com comprimento de onda de 830nm, fluência de radiação $30\text{J}/\text{cm}^2$, utilizando a técnica de varredura, durante 20 dias, uma vez ao dia. No grupo 3 os animais foram tratados com o laser arseneto de gálio e alumínio (GaAsAl), comprimento de onda 830nm, fluência da radiação $60\text{J}/\text{cm}^2$ por varredura, durante 20 dias, uma vez por dia. O tempo de aplicação da radiação foi ajustado automaticamente de acordo com a dose utilizada, sendo que este tempo variou de um grupo para o outro. Todos os aparelhos de laser utilizados nesta pesquisa eram da marca (KLB). Os animais do grupo 4 receberam tratamento com a pomada Dersani[®] (ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, lecitina de soja, vitamina A, vitamina E, ácido capróico e óleo de girassol - ácido linoléico), sendo aplicados 0,1g da pomada uma vez ao dia, durante 20 dias. Esta pomada é produzida pelo laboratório SANIPLAN e foi adquirida no comércio. O grupo 5, controle, consistiu de animais onde as feridas não receberam qualquer tipo de tratamento, sendo apenas limpas com solução fisiológica uma vez ao dia, durante 20 dias contínuos.

3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) e TUKEY. Para verificar qual tratamento se diferenciou dos demais procedemos à construção de um intervalo de confiança de 95% ao redor da média sendo efetuada a comparação

em modo gráfico. Todas as variáveis foram analisadas em relação a sua homocedasticidade e normalidade antes de aplicarmos a ANOVA. As análises foram efetuadas utilizando o programa Statistica 6.0 (STATOSOFT, 2001).

4. RESULTADOS

A média do peso corporal dos animais utilizados durante todo experimento variou de 281,83g a 350,16g apresentando um coeficiente de variação de 3.0038 (Tabela 1). Foi observada uma diferença estatística significativa do peso ($p=0,0001$) dos animais em relação aos diferentes tratamentos e o tempo. Verificou-se nos animais do grupo que receberam tratamento com Dersani[®] uma queda acentuada e significativa do peso no 4º dia do experimento, voltando a se recuperar no 8º dia. Os animais dos outros grupos que receberam tratamento com laser GaAsAl 30J/cm² e laser GaAsAl 60J/cm² também apresentaram grande variação em relação a variável peso (Figura 2).

Tabela 1 - Valores médios do peso corporal dos animais em função dos tratamentos nos diferentes dias.

Tratamento	PESO(g) NOS DIAS						Desvio padrão
	0	4	8	12	16	20	
Salina	341,66	333	342,83	332,16	350,16	332,16	7,41855
Dersani [®]	329,5	281,83	312,83	325,83	321,16	309,33	17,24811
Laser AsGa 4J/cm ²	332	321	335,16	327,5	330,5	322,66	5,49853
Laser GaAsAl 30J/cm ²	334,16	325,83	316,16	330,16	318,16	317,33	7,53357
Laser GaAsAl 60J/cm ²	335,66	315	317,66	321	307,66	318,5	9,25021

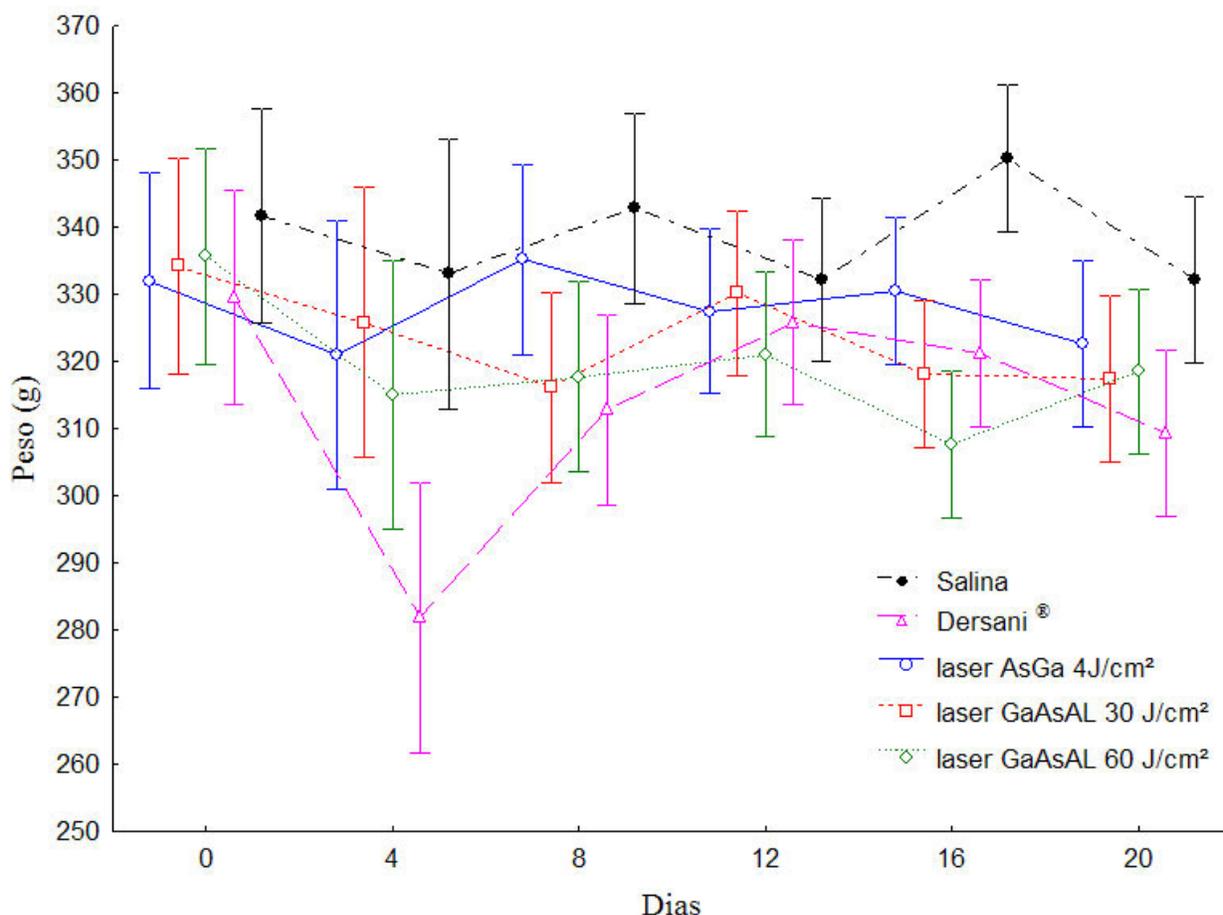


Figura 2 - Valores médios do peso corporal dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani® e diferentes tipos e intensidades de laser.

O tamanho da ferida foi medido durante todo o experimento sendo a quinta ferida utilizada como padrão para a realização das medidas. Os melhores resultados foram encontrados no grupo dos animais tratados com laser GaAs 4J/cm² que levou a redução de 94,76% da área da ferida em menor tempo no decorrer do experimento em relação à todos os outros tratamentos. O grupo dos animais tratados com laser GaAsAl 60J/cm² apresentou redução de 83,43% da área da ferida, enquanto os animais tratados com o laser GaAsAl 30J/cm² apresentaram redução da área da ferida de 77,6%. O grupo 5, constituído por animais tratados apenas com salina apresentou uma redução de 81% na área da ferida assim como o grupo que recebeu Dersani® (Tabela 2). Os animais dos grupos tratados com o laser GaAs 4J/cm² e laser GaAsAl 60J/cm² apresentaram diferenças significativas na redução da ferida no 8º dia do experimento em relação aos outros grupos (Figura 3). O laser GaAsAl 30J/cm² apresentou redução da área da ferida no dia 8, mas houve aumento da

área da ferida até o dia 4, sendo o mesmo observado com Dersani[®], porém este aumento foi menor. O mesmo não foi observado nos animais dos outros grupos, onde houve somente diminuição da área da ferida. Os valores médios da área da ferida dos animais em função do tratamento e do tempo estão apresentados na Tabela 3.

Verifica-se que os tratamentos, principalmente com o laser GaAs 4J/cm², apresentaram influência positiva na cicatrização das feridas, resultando em diminuição da área da ferida ao longo do tempo (p=0,0004), pois foi nessa modalidade de laser que a cicatrização ocorreu de forma mais rápida levando-se em consideração a velocidade média de fechamento da ferida (Tabela 4).

Tabela 2 - Área da ferida dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

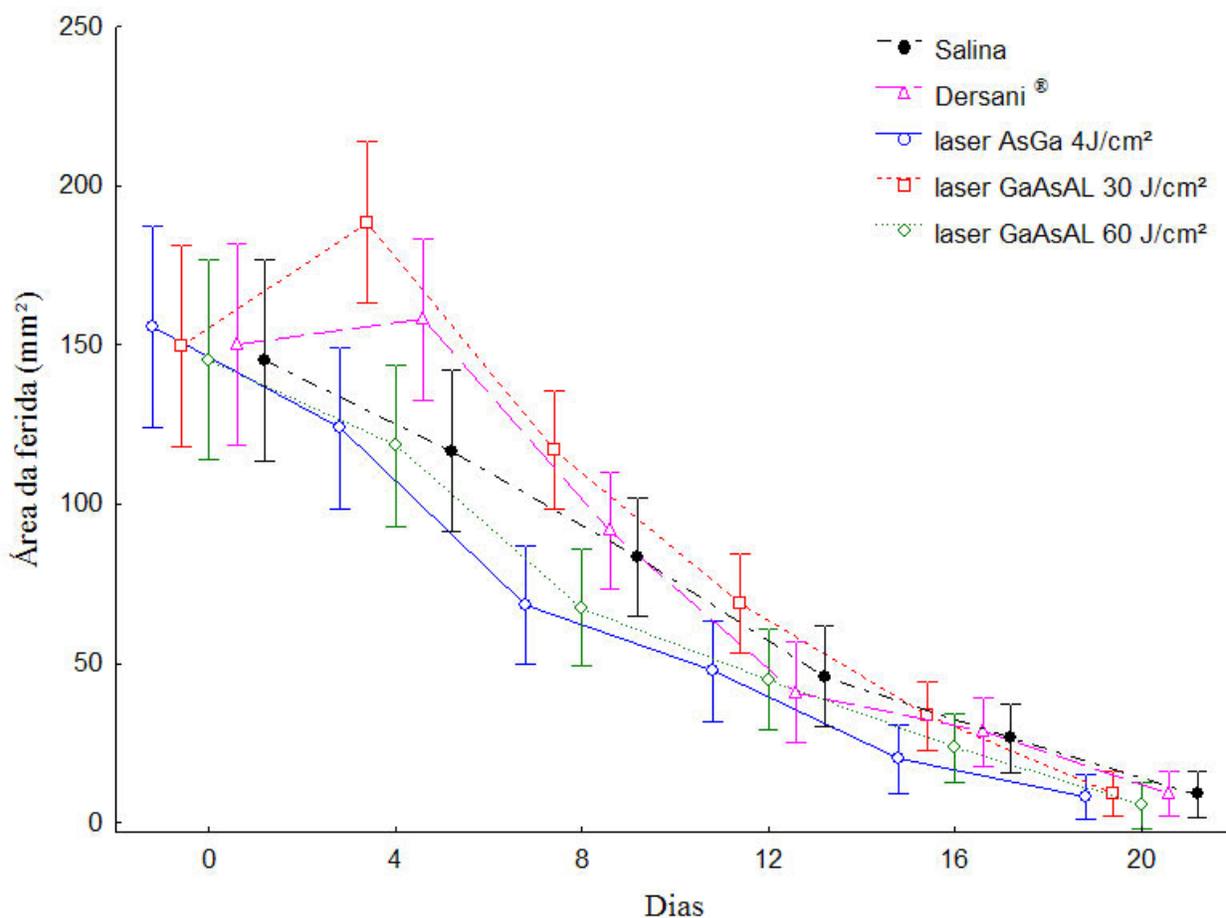
Tratamento	REDUÇÃO DA ÁREA DA FERIDA (%)
Salina	81
Dersani [®]	81
Laser GaAs 4J/cm ²	94,76
Laser GaAsAl 30J/cm ²	77,6
Laser GaAsAl 60J/cm ²	83,43

Tabela 3 - Valores médios da área da ferida dos animais em função do tratamento em diferentes dias.

Tratamento	ÁREA (mm²) DA FERIDA NOS DIAS						
	0	4	8	12	16	20	Desvio padrão
Salina	145	116,6	83,5	45,83	26,5	8,83	53,27380
Dersani [®]	150,16	158	91,66	40,83	28,5	9	63,82687
Laser AsGa 4J/cm ²	155,66	123,83	68,33	47,5	20	8,16	58,42347
Laser GaAsAl 30J/cm ²	149,5	188,5	117,16	68,83	33,5	9,16	69,33588
Laser GaAsAl 60J/cm ²	145,33	118,33	67,5	44,83	23,5	5,33	54,69229

Tabela 4 – Valores parciais de fechamento da área ferida em função do tratamento nos diferentes dias.

Tratamento	VELOCIDADE MÉDIA DE FECHAMENTO DA ÀREA DA FERIDA					
	4	8	12	16	20	Velocidade média
Salina	7,1	8,2	9,6	4,8	4,41	6,8
Dersani®	1,96	16,58	12,70	3,08	4,87	7,05
Laser AsGa 4J/cm ²	7,9	13,8	5,2	6,8	2,96	7,37
Laser GaAsAl 30J/cm ²	9,75	17,84	12,08	8,83	6,08	7,01
Laser GaAsAl 60J/cm ²	6,75	12,70	5,66	5,33	4,54	7,00



Os valores para a contagem global e diferencial de leucócitos nos dias 0 e dia 20 estão dispostos na Tabela 5, assim como os valores em separado de cada constituinte na contagem diferencial. Verifica-se que os tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes intensidades de laser não influenciaram o número global de leucócitos, indicando que não houve diferença estatística significativa (p=0,840). Quando levados em consideração os diferentes tratamentos e o tempo, também não foi observada diferença significativa na contagem global de leucócitos (p=0,900).

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão (DP) das variáveis sanguíneas dos animais, em função do tratamento, no início (dia 0) e final (dia 20).

	Laser AsGa 4J/cm ²		Laser GaAsAL 30 J/cm ²		Laser GaAsAL 60 J/cm ²		Dersani [®]		Salina	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
GLI	14920,0	3374,5	18366,7	3573,0	16600,0	3365,1	17783,3	2545,1	18140,0	2657,6
GLF	26840,0	7543,7	27766,7	8200,7	28400,0	9082,5	29733,3	7365,0	26400,0	3192,2
Mono I	3,2	3,3	1,5	1,5	0,3	0,5	2,2	1,7	2,2	1,9
Linfo I	70,6	8,2	75,2	7,7	74,5	5,9	75,3	8,0	79,6	3,8
Eosino I	0,8	0,8	1,2	0,8	2,7	0,5	1,7	1,4	0,8	0,8
Neutro I	25,4	6,8	22,2	7,3	20,7	6,6	20,8	7,1	17,4	4,2
Baso I	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mono F	6,4	2,5	3,7	1,0	5,8	3,4	9,8	5,0	3,6	1,9
Linfo F	69,2	5,3	68,0	8,8	80,3	7,0	70,0	11,1	65,0	9,5
Eosino F	0,8	0,4	1,7	1,0	2,3	3,8	1,0	1,1	1,6	1,3
Neutro F	23,6	4,0	26,5	10,0	11,5	3,7	19,2	8,8	29,8	8,5
Baso F	0,2	0,4	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Legenda:

GLI = Global Inicial de Leucócitos (mm³), GLF = Global Final de Leucócitos (mm³), MonoI = Monócitos Inicial (%), LinfoI = Linfócitos Inicial (%), EosinoI = Eosinófilos Inicial (%), NeutroI = Neutrófilos Inicial (%), BasoI = Basófilos Inicial (%), MonoF = Monócitos Final (%), LinfoF = Linfócitos Final (%), EosinoF = Eosinófilos Final (%), NeutroF = Neutrófilos Final (%), BasoF = Basófilos Final (%).

Na contagem diferencial de leucócitos, observou-se diferença estatística significativa para monócitos (p=0,019) em relação aos diferentes tratamentos e o tempo, sendo que os animais submetidos ao tratamento com Dersani[®] se diferenciaram dos animais que foram submetidos aos

outros tratamentos, pois a pomada promoveu o aumento do número de monócitos desses animais (Figura 4).

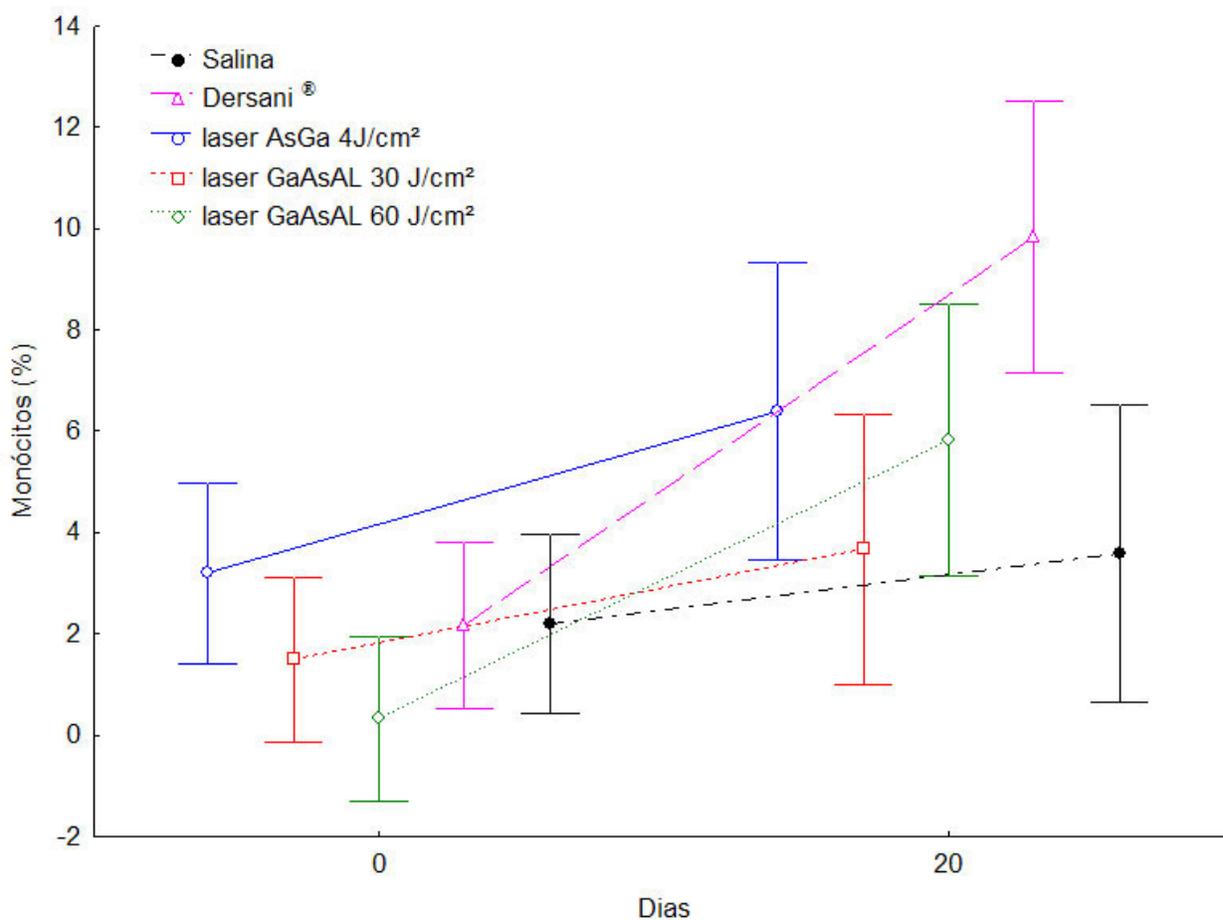


Figura 4 - Resultados da análise dos valores médios da contagem de monócitos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani® e diferentes tipos e intensidades de laser.

A análise da contagem diferencial de linfócitos e eosinófilos mostraram que não houve influência dos tratamentos com salina, Dersani® e diferentes tipos e intensidades de laser na quantidade dessas células, apresentando o linfócito ($p=0,266$) e o eosinófilo ($p= 0,082$).

A contagem de neutrófilos apresentou relação significativa ($p=0,022$) entre os diferentes tratamentos durante o tempo do experimento. Os animais dos grupos que foram tratados com salina e com o laser GaAsAl 30J/cm² apresentaram aumento no número de neutrófilos, sendo este aumento mais pronunciado nos animais tratados com salina esses dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Por outro lado, os animais tratados com o laser GaAsAl 60J/cm², laser GaAs 4J/cm² e Dersani® apresentaram diminuição na quantidade de

neutrófilos sendo que a maior redução, quando comparados o início e o final do tratamento, foi apresentada pelos animais dos grupos tratados com laser GaAsAl 60J/cm². Verifica-se também que não houve diferença na quantidade dessas células entre os animais dos grupos tratados com salina, laser GaAs 4J/cm² e do laser GaAsAl 30J/cm². Diferenças significativas foram observadas apenas entre o grupo tratado com salina, e aqueles tratados com Dersani[®] e laser GaAsAl 60 J/cm² (Figura 5).

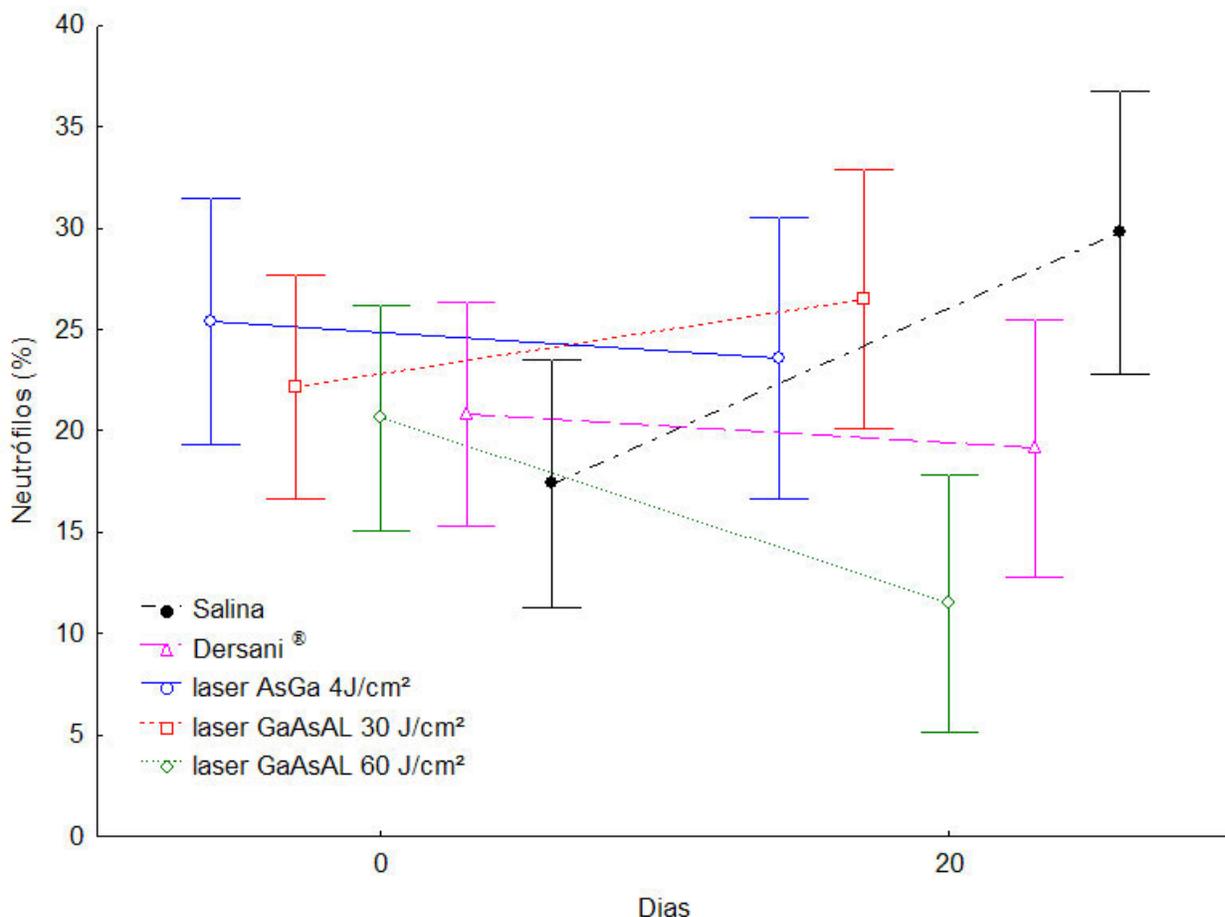


Figura 5 - Valores médios da contagem de neutrófilos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

A análise da quantidade de fibras colágenas do tipo I dos animais submetidos aos diferentes tratamentos não mostrou diferença significativa bem como não revelou interação entre tratamento e tempo nos diferentes grupos.

A análise das imagens de fragmentos de pele, sob polarização, mostrou que um número maior de fibras colágenas tipo III (medidas em porcentagem) foi observado nos tecidos dos

animais que receberam irradiação do laser GaAsAl 30J/cm², quando comparado com os animais que receberam outros tratamentos. Os animais tratados com laser GaAsAl 60J/cm² e os animais tratados com salina também apresentaram aumento de fibras colágenas tipo III, mas não houve diferença significativa entre esses tratamentos.

Os animais que receberam tratamento com Dersani[®] apresentaram produção de fibras colágenas tipo III igual aos animais tratados com salina. Animais tratados com laser GaAsAl 60J/cm² apresentaram um perfil de produção de fibras colágenas tipo III diferente dos grupos de animais tratados com Dersani[®]. Animais tratados com laser GaAs 4J/cm² apresentaram menor número de fibras colágenas tipo III (Figura 6). Então foi observada diferença estatística significativa da quantidade de colágeno (p=0,001) dos animais em relação aos diferentes tratamentos e o tempo. Os resultados de todas as análises estatísticas estão mostrados em tabelas no anexo.

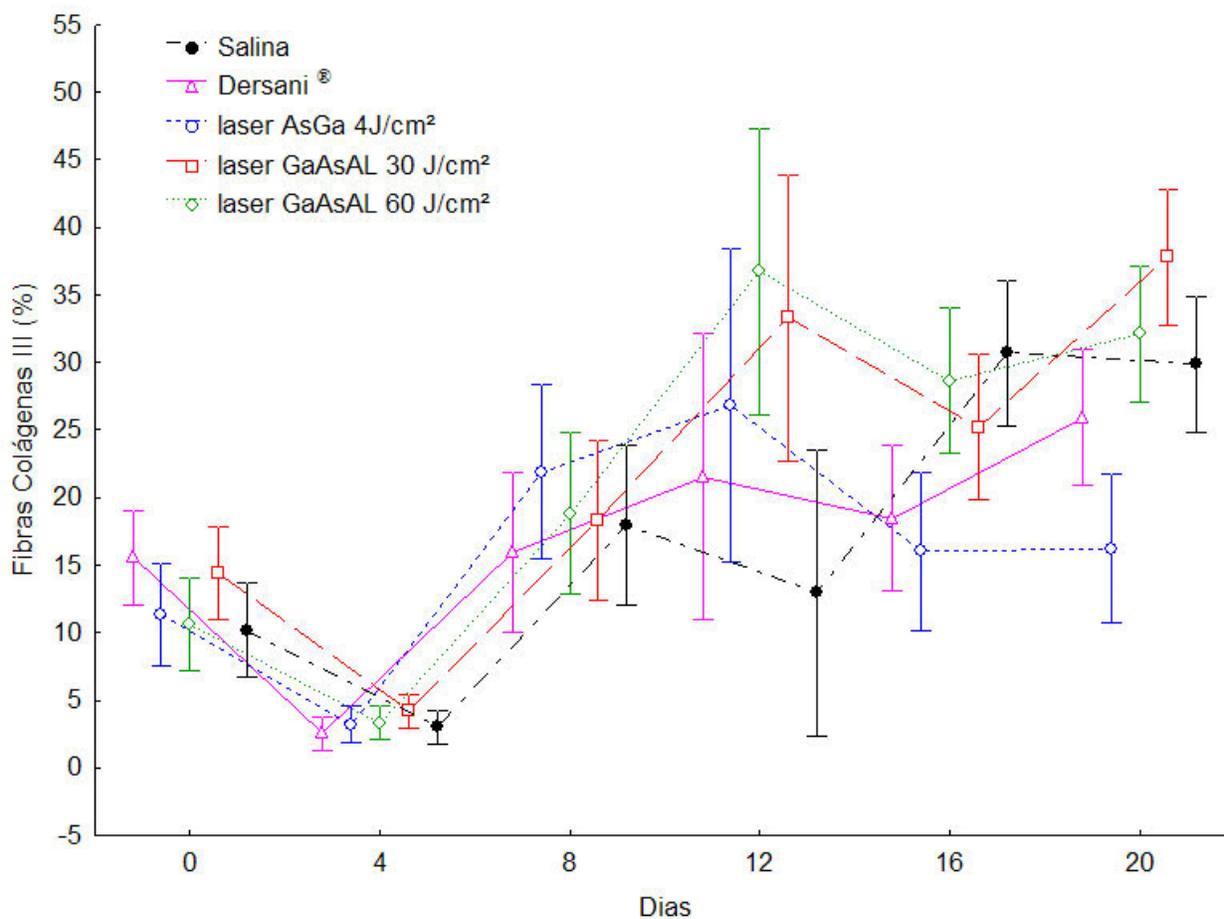


Figura 6 – Valores médios da contagem de fibras colágenas tipo III dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

Na Figura 7 são observadas fotomicrografias de secções histológicas de pele de ratos Wistar obtidas no 20º dia do experimento, coradas com picrossírius e observadas em microscópio de polarização. Observa-se a presença de fibras colágenas tipo I e fibras colágenas tipo III e sua distribuição. As fibras em vermelho são fibras colágenas do tipo I e as fibras que aparecem em verde e amarelo representam as fibras de colágeno tipo III. As regiões que aparecem escuras representam áreas onde não foram evidenciadas fibras de colágeno. Na Figura 7A, obtida dos animais controle tratados com salina, e na Figura 7B obtida de secções de pele de animais que receberam tratamento com Dersani[®] pode-se observar predominância de fibras colágenas do tipo III e regiões em preto que representam áreas onde não foram evidenciadas qualquer tipo de fibra colágena, enquanto as fibras colágenas do tipo I são observadas em menor quantidade. Quando comparado ao grupo tratado com salina, os animais tratados com Dersani[®] não apresentaram diferenças em relação às fibras de colágeno tipos I e III.

Na Figura 7C se observa uma fotomicrografia de fragmento de pele de animal que recebeu tratamento com laser GaAs 4J/cm², pode-se observar maior número de fibras colágenas do tipo I, quando comparado à quantidade dessas fibras nas secções histológicas obtidas dos animais tratados com salina e Dersani[®]. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos. Características semelhantes às apresentadas pelo laser GaAs 4J/cm² foram evidenciadas nos tecidos dos animais que receberam irradiação pelo laser GaAsAl 60J/cm², os quais apresentaram maior número de fibras colágenas do tipo I (Figura 7D), quando comparados ao grupo de animais que receberam tratamento com salina.

A Figura 7E representa a pele de animais que receberam irradiação do laser GaAsAl 30J/cm². Verifica-se nesse grupo de animais maior produção de fibras colágenas do tipo III, apresentando menor quantidade de espaços vazios quando comparado ao grupo da salina e a todos os outros grupos tratados. Esses resultados evidenciam a eficácia do tratamento com laser GaAsAl 30J/cm² para a produção de fibras colágenas tipo III. A quantidade de fibras colágenas do tipo I também foi mais evidente que no controle, apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatísticas significativas em relação aos outros grupos.

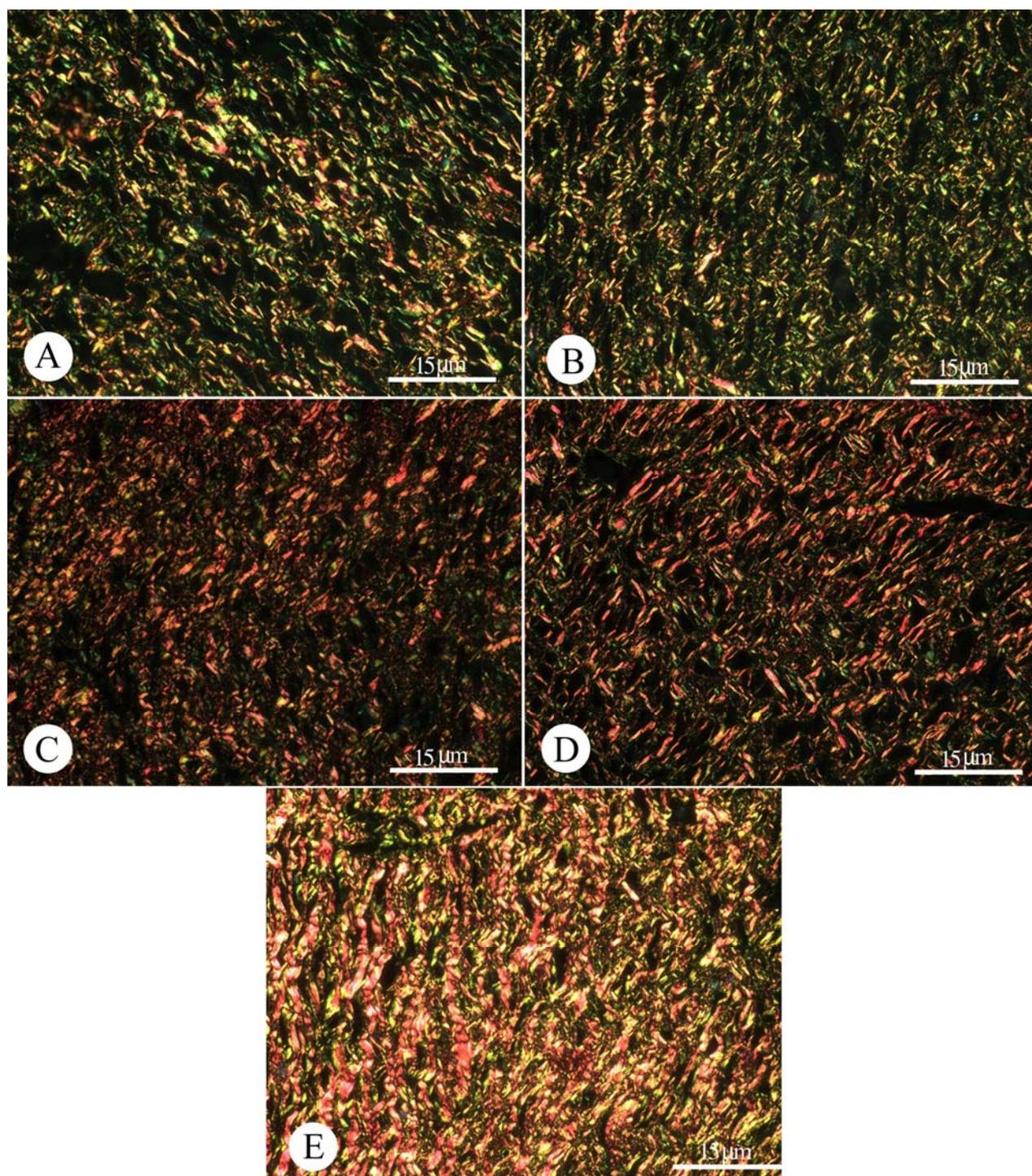


Figura 7 - Secções histológicas de pele de ratos Wistar no 20º dia do experimento coradas com picosírius e observadas ao microscópio de polarização. Animais tratados com: A- salina; B- Dersani[®]; C- laser GaAs 4J/cm²; D- laser GaAsAl 60J/cm²; E- laser GaAsAl 30J/cm².

5. DISCUSSÃO

O uso do laser como modalidade terapêutica tem aumentado muito nos últimos 10 anos MAIYA et al. (2005) em seu trabalho utilizando radiação laser He-Ne em feridas de ratos Wistar, mostraram que o grupo de animais tratados com o laser, cicatrizou melhor e mais rápido, aumentando também o conteúdo total de colágeno quando comparado ao grupo controle. Além disso, houve proliferação fibroblástica, capilarização e epitelização, indicando a eficácia deste tipo de tratamento, principalmente da energia do laser e de alguns comprimentos de onda que podem modular a proliferação celular e a liberação de fatores de crescimento pelos fibroblastos. Além de atuar diretamente no colágeno e nos fibroblastos o laser atua também na fotoestimulação, através das mitocôndrias que são fotoceptores para energia da luz. A absorção de energia pela cadeia transportadora de elétrons resulta em aumento no potencial elétrico através da membrana mitocondrial, aumentando a produção de ATP e ativação da síntese de ácidos nucleicos, aumentando o metabolismo. Isto também promove a produção de pró-colágeno aumentando a produção de pontes cruzadas das moléculas de colágeno e acelerando o reparo tecidual (PASSARELA et al., 1984). Esses são alguns pontos que podem justificar nossos dados e que mostram a eficácia do laser no reparo tecidual, na produção de colágeno e no fechamento das feridas (Tabela 4).

No presente estudo a média do peso corporal dos animais variou entre 281,83g a 350,16g (Tabela 1), sendo que valores semelhantes foram encontrados por FUNG et al., (2003) que trabalharam com a mesma linhagem de animais. Para SHARP & LA REGINA (1998), estudando a anatomia e as características fisiológicas de *Rattus Morvegicus*, o peso dos machos está entre 450g- 520g, valores esses maiores que os encontrados nesta pesquisa. No entanto, deve-se levar em consideração a idade e a linhagem desses animais. Foi observado ainda em relação ao peso que os animais dos grupos tratados com Dersani[®], apresentaram uma grande perda de peso em torno do 4° dia (Figura 2).

Quando analisados os dados de fechamento da ferida, os melhores resultados deste estudo foram encontrados nos animais que foram submetidos à radiação do laser GaAs 4J/cm² e GaAsAl 60J/cm² (Tabelas 2 e 3). Essa intensidade se destacou dos outros grupos principalmente no 8° dia de experimento. A velocidade de fechamento da área das feridas tratadas com essa modalidade de laser também ocorreu de forma mais rápida quando comparada aos outros grupos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados por SAY et al. (2003), que analisaram comparativamente o efeito do laser He-Ne e GaAs no tratamento de pacientes portadores de úlceras cutâneas venosas. Os pacientes submetidos ao tratamento com o laser GaAs de baixa intensidade, apresentaram redução da área da ferida a partir da sexta sessão de aplicação, com evolução positiva do quadro nas 12 sessões subsequentes, chegando ao fechamento total da ferida após 26 sessões de irradiação com o laser GaAs. Segundo SANFORD & WOODRUFF (2004) e WOODRUFF et al. (2004), a maioria dos autores descreve que existe influência positiva da terapia laser em vários parâmetros no reparo tecidual, incluindo redução da área da ferida e o tempo de cicatrização, sendo que estes dados estão relacionados com a densidade de energia. Segundo estes mesmos autores, densidades de energia de 19 a 24J/cm² foram mais efetivas do que as densidades abaixo de 8,25J/cm² e acima de 130J/cm² o que contrasta com nossos achados, onde os melhores resultados para o fechamento da ferida foram encontrados no laser GaAs 4J/cm². Por outro lado os dados de BYRNES et al. (2004), indicam aumento significativo no fechamento das feridas em animais tratados com o laser He-Ne 4J/cm², 3 dias após a lesão em comparação aos animais não irradiados com o laser indicando maior velocidade de fechamento da ferida.

Para LAGAN et al (2001), utilizando nove pacientes, o laser GaAsAl com densidade de energia de 9J/cm² não apresentou diferença significativa entre os indivíduos dos grupos tratados e os indivíduos dos grupos que não receberam irradiação com o laser, pois a cicatrização completa

(100%) da ferida, ocorreu nos indivíduos do grupo não tratado em comparação ao grupo tratado com o laser que teve cicatrização parcial (98%). Para esses autores este tipo de laser não proporciona qualquer tipo de vantagem particular no procedimento pós-cirúrgico de fechamento de feridas. Neste trabalho o laser GaAsAl 30J/cm² apresentou redução da área da ferida aproximadamente no dia 8, mas houve aumento da área da lesão até o dia 4, conhecido como retração cicatricial, o mesmo foi observado para os animais tratados com Dersani[®], porém este aumento foi menor, o que não foi observado nos animais tratados com solução salina, nestes animais houve somente diminuição da área da ferida (Figura 3). Já o laser GaAsAl 60J/cm², que apresenta uma densidade de saída de energia ainda maior, apresentou redução de 83,43% da área da ferida (Tabela 2). Esses dados indicam que são necessárias pesquisas mais efetivas relacionando as intensidades do laser e o processo de fechamento das feridas.

Em relação ao número de monócitos no início e no final dos tratamentos entende-se que a quantidade dessas células não foi influenciada pelas irradiações com diferentes intensidades e tipos de lasers. Segundo HEMVANI et al., (1998), descreveram que a exposição de monócitos ao laser de baixa potência aumenta capacidade de multiplicação dessas células, aumentando também o conteúdo celular alterando, por exemplo, a quantidade de algumas organelas. Neste trabalho o aumento significativo só foi observado no sangue dos animais que receberam tratamento com a pomada Dersani[®] (Figura 4).

Quando levada em consideração a quantidade de neutrófilos, os animais dos grupos tratados com salina apresentaram aumento significativo, o que não foi observado nos outros grupos (Figura 5). Isso pode sugerir a presença de infecção, já que os neutrófilos constituem importante defesa celular contra a invasão de microorganismos e o aumento na produção de neutrófilos pela medula óssea vermelha, geralmente está associado a infecções (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Os grupos tratados com os diferentes tipos e intensidades de lasers, não apresentaram aumento significativo no número dessas células o que pode indicar também a capacidade do laser de auxiliar no controle de infecções. No entanto seriam necessários dados mais precisos para confirmar essas hipóteses, já que em nosso trabalho não foi evidenciado nenhum tipo de infecção abundante, e as medidas necessárias de assepsia foram tomadas durante todo o experimento. Os valores médios de todas as variáveis sanguíneas em função do tratamento estão mostrados na Tabela 5.

MENDEZ et al. (2004), em seu trabalho utilizando ratos Wistar e duas modalidades de laser, estudaram a pele desses animais e observaram a presença de grande quantidade de fibras colágenas difusamente distribuídas sobre os vasos sanguíneos e 5 dias após o ferimento todas as amostras apresentaram tecido de granulação rico em fibroblastos. Também foi observado aumento na deposição de fibras colágenas nos animais tratados quando comparados aos animais que não receberam irradiação com o laser, com exceção do grupo que foi irradiado pelo laser He-Ne $50\text{J}/\text{cm}^2$. A resposta inflamatória dos animais irradiados ocorreu mais cedo, sugerindo que o laser permitia que a inflamação começasse mais precocemente, interferindo diretamente no processo cicatricial. Esses dados suportam nossos achados de que o laser GaAsAl $30\text{J}/\text{cm}^2$ promove a proliferação de fibras colágenas tipo III, acelerando assim a deposição do colágeno e o processo de cicatrização (Figura 6).

Neste trabalho a modalidade e intensidade de laser que se mostrou mais efetiva, para a produção de fibras colágenas tipo III, foi o laser GaAsAl $30\text{J}/\text{cm}^2$, já que na produção de fibras colágenas tipo I não houve diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos (Figura 7). A proliferação de fibras colágenas promovidas pela radiação com o laser também foi observada por FUNG et al. (2003), analisando o efeito terapêutico do laser GaAsAl $63,2\text{J}/\text{cm}^2$ na ultra-estrutura e morfologia do reparo do ligamento colateral medial (LCM) em ratos. Esses autores observaram que os animais que receberam a radiação laser apresentaram fibras mais largas que os controles, sendo a distribuição dessas fibras similar nos grupos que receberam irradiação durante 3 e 6 semanas. Nos grupos irradiados com o laser GaAsAl $63,2\text{J}/\text{cm}^2$ também foi observado maior número de fibras colágenas por área de secção transversal. De acordo com GABRIEL et al. (2004), múltiplas aplicações do laser na ferida podem melhorar a ultra-estrutura e a morfologia do colágeno e o reparo após três semanas de secção completa.

Torna-se evidente a importância de buscar novas técnicas que promovam maior eficiência do processo cicatricial, as diferentes modalidades de laser vêm se destacando neste sentido, acelerando a cicatrização e promovendo melhora no bem estar do paciente.

6. CONCLUSÕES

Considerando a importância da identificação e utilização de técnicas apropriadas que promovam uma maior eficiência no processo cicatricial, o presente trabalho avaliou o efeito cicatrizante do laser arseneto de gálio e alumínio (GaAsAl) de $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $60\text{J}/\text{cm}^2$ e do laser arseneto de gálio (GaAs), $4\text{J}/\text{cm}^2$, comparando com a pomada Dersani[®], através da avaliação da quantidade de fibras colágenas tipo I e tipo III, durante o processo cicatricial.

Os dados obtidos mostraram que os animais tratados com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades do laser, influenciaram o peso dos animais quando relacionados ao tempo.

Observou-se que o tratamento mais efetivo para diminuir a área da ferida foi o laser GaAs $4\text{J}/\text{cm}^2$, o qual mostrou uma redução de 94,7% da área da ferida, seguido pelo laser GaAsAl $60\text{J}/\text{cm}^2$ que levou a uma redução da área da ferida de 83,43%.

O tratamento com diferentes tipos e intensidades de raios laser não influenciou significativamente o número global de leucócitos no sangue.

Os animais que receberam tratamento com Dersani[®] apresentaram aumento significativo na contagem diferencial, no número de monócitos, e os animais tratados com salina apresentaram aumento na contagem diferencial no número de neutrófilos.

Os diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos e eosinófilos na contagem diferencial.

A maior quantidade em porcentagem de fibras colágenas tipo III, foi observada nos tecidos obtidos de animais que receberam irradiação com laser GaAsAl $30\text{J}/\text{cm}^2$, sendo que os grupos que receberam os outros tratamentos não apresentaram aumento significativo.

Os diferentes tratamentos não mostraram diferenças significativas quanto ao número de fibras colágenas tipo I.

Verifica-se que os tratamentos, principalmente com o laser GaAs $4\text{J}/\text{cm}^2$, apresentaram influência positiva na cicatrização das feridas, resultando em diminuição da área da ferida ao longo do tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ªed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p.580, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ªed., São Paulo: Guanabara Koogan Editora, p 872, 2005.
- BADYLACK, F. S. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Cell & Development Biology**, v. 13, p.377-383, 2002.
- BRASILEIRO FILHO, G . **Patologia Geral**, 2º ed, São Paulo; Guanabara Koogan. P.62-65,1998.
- BREUGEL, V. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. **Journal of Neurocytology**, v.22, p.185-190, 1993.
- BROMILEY, M. W. The machines and their uses. In: **Equine Injury, Therapy and Rehabilitation**. 2º ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, v. 3, p.61-116, 1993.
- BROW, D. H. The versatile contact ND:YAG. Laser in head and neck surgery. An in vivo and clinical analysis 2000. **The Laryngoscopia** , v.110, p. 854-866, 2000.
- BYER, T. A . Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. **Experimental Cell Research**, v.287, p.228-236, 2003.
- BYRNES, K. R., BARNA, L., CHENAULT, M., WAYNANT, R. W., ILEV, I. K., LONGO, L., MIRACCO, C., JOHNSON, B., ANDERS J. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, p.281-290, 2004.
- CALDEIRA, S. I. B. Fisioterapia ganha cada vez mais espaço. **Saúde Equina**, v.3, p. 61-116, 1997.

- CARVALHO, P. T. C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos. (**dissertação**). São Carlos: Universidade de São Paulo, p.72, 2002.
- CHIN, D., BOYLE, G. M., PARSONS, P. G., COMAM, W. B. What is transforming growth factor- beta (TGF-β). **Journal Invest Dermatol.** v.57, p.215-221, 2004.
- CLARK, R. A. F. Biology of dermatol wound repair dermatological clinics. **Journal Invest Dermatol.** v.1, n.4, p.647-661,1993.
- COLLINS T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: ROBBINS, S. L et al., **Patologia Estrutural e Funcional.** 6° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora. Cap.4, p.79-100, 2000.
- CRUAÑES, J. C. **La Terapia Laser, Hoy.** Barcelona: Centro documentación laser de meditec, S. A, p.164, 1984.
- CUZZEL, J., KRASNER, D. **Curativos. In: Gogia P. Feridas – Tratamento e Cicatrização.** Rio de Janeiro: Livraria Editora Revinter Ltda. Cap 9, p.103-114, 2003.
- DANTAS, C. J. S., SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, p.173-225, 2000.
- DEALEY, C. **Cuidando de Feridas: Um Guia para as Enfermeiras.** 2° ed. São Paulo: Atheneu Editora. Cap 4, p.40-65, cap. 4, p.68-89, cap. 9, p.200-207, 2000.
- ENWEMEKA, C. S., PARKER, J. C., DOWDY, D. S., HARKNESS, E. E., SANFORD, L. E., WOODRUFF, L. D. The efficacy of low- power lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. **Photomedicine and Laser Surgery,** v. 22, p. 323-329, 2004.
- FUNG, D. T.C., GABRIEL, Y. F., LEUNG, M. C. P., TAY, D. K. C. Effects of a therapeutic laser on the ultrastructural morfology of repairing medial collateral ligament in a rat model. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 32, p.286-293, 2003.
- GABRIEL, Y. F., FUNG, D. T. C., LEUNG, M. C. P., GUO, X. Ultrastructural comparison of medial collateral ligament repair after single or multiple applications of GaAlAs laser in rats. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 35, p. 317-323, 2004.
- GUIRRO, R. R. J, GUIRRO, E. C. **Fisioterapia Dermato-funcional: Fundamentos, recursos e patologias.** 3 ed. São Paulo: Manole, cap. 5, 2002.
- HARRIS, D. M. Biomolecular mechanisms of laser bioestimulation. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery,** v.9, p.277-280, 1991.

- HEMVANI, N., CHITNIS, D. S., BHAAGWANANI, N. S. Effect of helium-neon laser on cultured human macrophages. **Laser Therapy**, v.10, p.150-164, 1998.
- IHSAN, M. F. R. Low-Level Laser Therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, p. 289-294, 2005.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.173-193, 2005.
- KIERSZENBAUM, A L. **Histologia e biologia celular. Uma introdução à patologia**. 2º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.3-53, 2004.
- KOROLKOVAS., A., BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, P. 39-41, 1985.
- KOSACHENCO, B. G., SCHIMITT, I., FRATOCCHI, C. L. G. Avaliação clínico-funcional e radiológica dos efeitos da terapia laser arseneto de gálio na reparação de tecido ósseo em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p.79-84, 1995.
- LAGAN, K. M., CLEMENTES, B. A., MCDONOUGH, S., BAXTER, G. D. Low intensity laser therapy (830nm) in the management of minor postsurgical wounds: A controlled clinical study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.32, p.28-27, 2001.
- LAMAS, M. C. S. Laser a diodo de arseneto de gálio (As-Ga) aplicado às fraturas do terço médio do rádio em cães. (**dissertação**). Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1999.
- LANGE, F., KROTH, A., STEFFANI, J. A., LORENCETTI, N. Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, p.335-340, 2003.
- MAIYA, G. A., KUMAR, P., RAO, L. Effect of low helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, p.187-190, 2005.
- MALDEBAUM, S. H., SANTIS, E. P., MAIDEBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.521-522, set/out. 2003.
- MANWARING, M. E. Contact guidance induced organization of extracellular matrix. **Journal Invest Dermatol**, v.25, p.3631-3638, 2004.
- MANZANARES, L., RUIZ, G., CLAROS, L., MORILLO, M. Efectos de la irradiación láser He-Ne sobre el cartílago de crecimiento. **Rehabilitacion**, v.24, p.211-214, 1990.
- MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-87, 1997.

- MENDEZ, T. M. T. V., PINHEIRO, A. L. B., PACHECO, M. T. T., NASCIMENTO, P. M., RAMALHO, L. M. P. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v.22(1), p19-25, 2004.
- MIKAIL, S. Laser e ultra-som: novas abordagens. **Saúde Equina**, v.3, p.9, 1997.
- NASCIMENTO, P. M., PINHEIRO, A. L. B., SALGADO, M. A. C., RAMALHO, L. M. P. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: Histological study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, p. 513-518, 2004.
- NORMAN, R. A., BOCK, M. Wound care in geriatrics. **Dermatologic Therapy**, v.16, p 224-230, 2003.
- PARK, E. J., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.187, p. 11-16, 2004.
- PASSARELA, S., CASAMASSIMA, S., MOLINARI, D., PASTORE, E., QUAGLIARELLO, I. M., CATALANO, CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.175, p.95-99, July 1984.
- PAURREAU-SCHNEIDER, N., AHMED, A., SOUDRY, M., JACQUEMIER, J., KOOP F, FRANQUIN, J. C, MARTIN, P. M. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **American Journal of Pathology**, v.137, p.171-178, 1990.
- PUETT, D. W., GRIFFIN, M. R. Published trials of nonmedicinal and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis. **Annals International Medicine**, v.121, p.133-140, 1994.
- REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wound. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 344-351, 2003.
- RITSON, D. F. Lasers and Osteoarthritis. **Orthopaedics**, v.16, p.541-542, 1993.
- ROIG, J. L. G., TRASOBARES, E. M. L., SANCHES, H. M., ALVAREZ, A. V. J. Tratamiento de las úlceras por presión en el lesionado medular con laser de baja potencia y cirugía. Presentación de un caso. **Revista Cuba Ortopaedics Traumatology**, v.4, p.41-45, 1990.
- SANFORD, L. E., WOODRUFF, L.D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, p.323-329, 2004.

- SAY, K. G., RENNO, A. C., GONÇALVES, R. C., PARIZOTTO, N. A. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. **Fisioterapia Brasil**, v. 4(1), p.39-48, 2003.
- SCHIMITT, I., RAISER, A. G., GRAÇA, D. L. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (As Ga) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 30, p.145-149, 1993.
- SCHOEN, F. J., COTRAN, R. S. **Patologia Estrutural e Functional**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1996.
- SEITZ, L. M., KLEINKORT, M. A. Low-power laser: Its applications in physical therapy. In: MICHLOVITZ, S.L; WOLF, S.L. **Thermal Agents in Rehabilitation**. Philadelphia: F.A. Davis Company, p.217-238, 1986.
- SERAFIM, F., TEODOROSK, R. C. C. Laser arseneto de gálio (Ga-As) no tratamento das algias provocadas pela disfunção temporomandibular: estudo piloto. **Fisioterapia Brasil**, v.4, p.32-38, 2003.
- SHARP, P. E., LA REGINA, M. C. The Laboratory Rat. Boca Raton: CRC Press, p. 1-19, 1998
- STADELER, J. The effects of low-level laser irradiation on lymphocytes from peripheral blood. In: **Annual meeting of Lasers in Surgery and Medicine**, p.16-18, 1999.
- STATSOFT., Inc (2001) STATISTICA (data analysis software system) Version 6. www.Statsoft.com.
- TAKEHARA, K. Growth regulation of skin fibroblast. **Journal of Dermatology Science**, v.24 (suppl), p.70-77, 2000.
- TAYLOR, R. A., LESTER, M., GRANNON, J. R. Physical therapy in canine sporting breeds. In: BLOOMBERG, M.S; DEE, J.F; TAYLOR, R.A. **Canine Sports Medicine and Surgery**. Philadelphia: w.b. Saunders, p.265-274, 1998.
- TOWBRIDGE, H. O., EMLING, R.C. **Inflamação uma revisão do processo**. São Paulo, 4º ed. Editora limitada, p.137-148, 1993.
- VASCONCELOS, G. F., FERREIRA, A. J. A, OLIVEIRA, A. S. L. O laser mole e sua aplicação clínica em medicina veterinária. **Revista Portuguesa Ciência Veterinária**, v.79, p.291-298, 1984.

WOODRUFF. L. D., BOUNKEO, J., BRANNON, W. M., DAWES, K. Jr., BARHAM, C. D.,
WADDEL, D. L., ENEWEKA, C. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-
analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, p.241-247, 2004.

ZHANG . The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischemic skin wounds.
The Bristh Association of Surgeous Plastic, v.11, p.647-661, 2003.

8. ANEXO

Tabela 1 - Resultados da análise de variância do peso dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	2,46	0,0716
Tempo	5	13,60	0,0001
Tempo*Tratamento	20	4,88	0,0001

* grau de liberdade ** valor de F *** valor de p

Tabela 2 - Resultados da análise de variância da área da ferida dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	2,8741	0,043615
Tempo	5	276,8788	0,000000
Tempo*Tratamento	20	2,7126	0,000404

* grau de liberdade ** valor de F *** valor de p

Tabela 3 - Resultados da análise de variância da contagem global de leucócitos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	0,3513	0,840392
Tempo	1	51,4661	0,000000
Tempo*Tratamento	4	0,2605	0,900197

*grau de liberdade **valor de F ***valor de p

Tabela 4 - Resultados da análise de variância da contagem de monócitos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com Salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	2,91517	0,043569
Tempo	1	42,36796	0,000001
Tempo*Tratamento	4	3,62303	0,019750

*grau de liberdade ** valor de F *** valor de p

Tabela 5 - Resultados da análise de variância da contagem de linfócitos e eosinófilos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com Salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Linfócitos	23	1,397	0,266394
Eosinófilos	23	2,36304	0,082988

* grau de liberdade **valor de F *** valor de p

Tabela 6 - Resultados da análise de variância da contagem de neutrófilos dos animais em função do tempo e dos tratamentos com Salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	3,0646	0,036743
Tempo	1	0,1858	0,670408
Tempo*Tratamento	4	3,5112	0,022319

*grau de liberdade ** valor de F *** valor de p

Tabela 7 - Análise dos valores médios da quantidade de colágeno I em função do tempo de ratos submetidos a tratamentos com salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	P***
Tratamento	4	0,60	0,663
Tempo	5	71,71	0,000*
Tempo*Tratamento	20	0,57	0,926

* grau de liberdade **valor de F *** valor de p

Tabela 8 - Resultados da análise de variância da quantidade de colágeno III em função do tempo e dos tratamentos com Salina, Dersani[®] e diferentes tipos e intensidades de laser.

	g.l*	F**	p***
Tratamento	4	8,23	0,000*
Tempo	5	49,40	0,000*
Tempo*Tratamento	204	3,30	0,000*

*grau de liberdade **valor de F *** valor de p