

# Avaliação do Efeito Biomodulatório Local e à Distância por Laserterapia Infravermelha e Vermelha na Cicatrização de Feridas em Dorso de Ratos

Analysis of Local and Distant Biomodulatory Effects by Red and Infrared Lasertherapy on Cutaneous Wounds Healing on the Dorsum of Rats

Marcello Gaieta Vannucci<sup>1</sup>, Angelo Luiz Freddo<sup>2</sup>, Aline Adelaide Paz da Silva Duarte<sup>3</sup>, João Feliz Duarte Moraes<sup>4</sup>, Adriana Etges<sup>5</sup>, Marília Gerhardt de Oliveira<sup>6</sup>

## Abstract

**Objectives:** This study aims to verify whether red and infrared lasers can interfere with the healing process of wounds located at the point of application and at distance. **Materials and methods:** Three circular wounds were conducted on the dorsum of rats, being one in the cranial region, another one in the medial region, and a third one in the caudal region. For this experimental study, 45 animals were investigated and divided into three groups, to which 15 animals were submitted to no laser of any kind, 15 animals were submitted to infrared laser, and 15 animals were submitted to red laser. The observation period was of three, five, and seven days. Thus, each group was divided into three subgroups (A, B, C) based on the observation period. For groups II and III the amount of energy during the irradiation was 8J/cm<sup>2</sup>, applied after the surgery and then every 48 hours, totalizing, depending on the time of death of the animal, two, three or four irradiations. **Results:** There was higher presence of edema in among 3 and 5 day period of analysis and acute inflammatory process were found in red laser irradiation study group. Quantitatively, there was no statistically significant difference in the percentage of reduction of wounds in and among the groups. **Conclusions:** There is no statistical difference were found by the therapy with low power red and infra-red laser in the wound sizes during all period of analysis.

**Keywords:** photodynamic therapy, wound healing, low level laser therapy.

## Resumo

**Objetivos:** Este estudo tem por objetivo verificar se os lasers vermelho e infravermelho podem, ou não, interferir no processo cicatricial de ferimentos localizados no ponto de aplicação e a distância deste. **Materiais e métodos:** Foram realizados três ferimentos circulares em dorso de ratos, na região cranial, na região medial e na região caudal. Para este estudo experimental foram analisados 45 animais, divididos em três grupos, onde 15 animais não sofreram irradiações, em 15 animais foi aplicado laser infravermelho e em 15 animais foi aplicado laser vermelho. O período de observação foi de três, cinco e sete dias. Assim, cada grupo foi dividido em três subgrupos (A; B; C), de acordo com período de observação. Para os grupos II e III a dose de energia das irradiações foi de 8J/cm<sup>2</sup>, aplicados após o término da cirurgia e a cada 48 horas, totalizando, na dependência da época da morte do animal, duas, três ou quatro irradiações. **Resultados:** Houve maior presença de edema e processo inflamatório agudo nos períodos entre 3 e 5 dias para o grupo irradiado com laser vermelho e quantitativamente não houve diferença estatisticamente significante no percentual de redução das feridas intra e inter-grupos. **Conclusões:** A aplicação do laser vermelho como infravermelho não demonstrou diferença na redução quantitativa nos tamanhos das feridas durante os períodos de cicatrização analisados.

**Palavras chave:** Terapia fotodinâmica, cicatrização, terapia a laser de baixa intensidade.

<sup>1</sup> MSc, Cirurgia Oral e Bucomaxilofacial, Doutorando PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> PhD, Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Cirurgia Oral e Bucomaxilofacial, Mestranda PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> PhD, Professor Adjunto da Faculdade de Matemática da PUCRS e UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>5</sup> PhD, Professora Titular da Faculdade de Odontologia da UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>6</sup> PhD, Professora Titular da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil - Pesquisadora por Produtividade – CNPq.

**Correspondência:** Professor Angelo Luiz Freddo

**Endereço:** Faculdade de Odontologia da UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492 (3º andar), CEP: 90035-003 – Porto Alegre, RS/Brasil

**Fone:** (51) 92574571

**Email:** angelofreddo@gmail.com

Data de Submissão: 01/06/2012

Data de Aceite: 29/11/2012

## Introdução

O processo de reparo de feridas é um fenômeno biológico fundamental e que abrange todos os aspectos de proliferação celular, diferenciação celular, síntese e secreção de proteínas, proteoglicanos e outras substâncias extracelulares, assim como a inflamação em seus vários parâmetros. Apresenta complexidade biológica e bioquímica e seu início ocorre logo após a injúria (ENOCH e LEAPER, 2005).

O reparo de ferimentos em tecidos moles é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. A fase inflamatória é traduzida pelo aumento na permeabilidade capilar e afluxo de células sangüíneas para a região da ferida. Durante a segunda fase, os fibroblastos afluem para o local da ferida e são acompanhados por notável proliferação endotelial. A última fase, por sua vez, corresponde à migração epitelial (ENOCH e LEAPER, 2005).

O efeito de biomodulação inflamatória propiciado pelo laser em baixa intensidade tem sido estudado desde os seus primórdios, quando os primeiros estudos da aplicabilidade biológica do laser se iniciaram (CHOW e BARNESLEY, 2005). A maioria das pesquisas *in vivo* demonstra a ação do laser não-ablativo sobre a síntese e a remodelação de colágeno, o número de fibroblastos, o diâmetro e a força de tração das feridas tratadas, a viabilidade dos enxertos tratados, a vascularização, a vasodilatação, o sistema linfático, os efeitos antibacteriano e imunológico, assim como os seus efeitos sistêmicos (SAITO e SHIMIZU, 1997).

Com efeito, a terapia fotodinâmica, através da laserterapia de baixa potência, após os estudos comprovados em animais, pode

ser complementar em situações humanas específicas (HENRIQUES, CAZAL e CASTRO, 2010; BRAIMAN *et al.*, 2007). No entanto, muitos são os resultados conflitantes publicados na literatura científica em todos estes anos, e assim, é de suma importância que pesquisas neste campo tenham caráter minucioso e criterioso, com objetivo de reduzir potenciais vieses e direcionar de forma mais coerente a aplicação, ou não, do laser em situações específicas. Dessa forma, a comunidade científica contribuirá de maneira significativa para a aplicabilidade clínica do laser de baixa potência como método seguro, eficiente e eficaz no reparo de feridas cirúrgicas.

Esta pesquisa objetivou verificar, em feridas padronizadas no modelo animal rato, se os lasers (vermelho e infravermelho) podem, ou não, interferir na cicatrização de ferimentos localizados no ponto de aplicação e à distância deste e, se existir, a qual tipo de irradiação o organismo responde sistemicamente melhor.

## Materiais e Métodos

Esta pesquisa respeita os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 11.794/2008 (Brasil). A pesquisa foi aprovada pelo CEUA-PUCRS sob protocolo 10/00170.

O modelo animal utilizado foi rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, macho, com peso variando de 200 a 250 gramas, clinicamente sadio.

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em três grupos distintos (I; II; III), com quinze animais em cada um, totalizando 45. Em todos os grupos o período de observação foi de três, cinco e sete dias. Assim, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A; B; C), de acordo com período de observação.

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção intraperitoneal, contendo sedativo 0,025 ml/100g, Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de Ketamina 10% na dose de 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal. Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal, por arrancamento dos pêlos. A antisepsia da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%. A área operatória foi isolada com campo cirúrgico fenestrado esterilizado. O *punch* metálico com 1 cm de diâmetro e com ranhuras de 1 mm em sua superfície, para marcação da profundidade de penetração, foi posicionado perpendicularmente à superfície da pele, junto à linha média e próximo à cabeça do animal, promovendo-se movimentos giratórios para facilitar a penetração da lâmina (Figura 1). Posteriormente, utilizou-se lâmina de bisturi de nº 15, associada com a pinça tipo Adson-Brown, para remover, delicadamente, a quantidade de tecido marcada para a produção de uma lesão de 1 mm de profundidade e 1 cm de largura, sendo tal procedimento repetido a uma distância de 7 cm da primeira ferida e novamente a 7 cm da segunda.

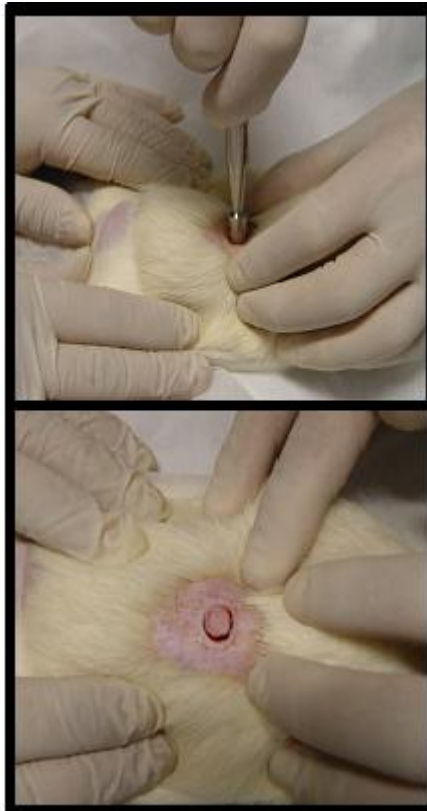


Figura 1 - Incisões circulares com bisturi de punch,

O grupo I foi utilizado como controle e não foi irradiado com laser. No grupo II foi utilizado o laser infravermelho (GaAl)As, com potência de 50mW e comprimento de onda de  $\lambda=830\text{nm}$ , com emissão contínua. No grupo III foi utilizado laser vermelho (In-Ga-Al-P) com  $\lambda$  de 685 nm,  $\varnothing=0,2\text{ mm}^2$ , no modo pontual e emissão contínua.

Para os grupos II e III a dose de energia, durante as irradiações foi de  $8\text{J}/\text{cm}^2$  após o término da cirurgia e a cada 48 horas, totalizando, na dependência da época da morte do animal (três, cinco ou sete dias), duas, três ou quatro irradiações. Em todos os grupos que receberam aplicações de laser padronizou-se que somente a ferida próxima à cabeça receberia irradiação. A aplicação foi realizada de forma pontual, no centro do ferimento.

Para a obtenção das amostras, os animais foram mortos aos três, cinco e sete dias de pós-operatório, respeitando as normas expressas na Lei Arouca vigente no Brasil.

As três lesões estabelecidas por animal foram dissecadas em forma de uma elipse, com uma lâmina de bisturi de nº 15, estabelecendo-se uma margem de segurança para não danificar a peça. O material removido foi fixado em solução de formalina tamponada a 10%, durante 48 horas. Cada recipiente foi identificado com o número do animal e o do grupo e sua zona respectiva (1 – cranial; 2 – medial; 3 – caudal), totalizando 135 amostras.

Após fixação e inclusão em parafina os blocos foram identificados e submetidos a microtomia, com cortes de  $5\text{ }\mu\text{m}$ , e corados com a técnica de HE. Foi utilizado um microscópio da marca Olympus BX<sup>®</sup> 50 F<sub>3</sub>, com uma ocular de 10X de aumento e objetivas de 3,2X e 10X de aumento. As lâminas foram identificadas com um código para garantir que, durante a leitura, o examinador desconhecesse a qual grupo pertencia cada lâmina observada.

Por serem representativos do processo de cicatrização, estabeleceu-se como critérios de avaliação a presença ou não de

hiperemia, edema, hemorragia, linfócitos, neutrófilos, fibroblastos, necrose e corpo estranho, de acordo com os seguintes critérios:

Edema: presente ou ausente (valor 0, valor 1), observado pela presença de líquido extracelular e pelo maior espaçamento entre os constituintes do tecido analisado;

Hiperemia: contagem do número de vasos sanguíneos abertos. Se o número de vasos sanguíneos corresponder a até 10% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 1 (um), ou seja, hiperemia leve; se o número de vasos sanguíneos corresponder entre 10 e 50% atribuiu-se o valor 2 (dois) ou hiperemia moderada e se o número de vasos sanguíneos corresponder a mais de 50% atribuiu-se o valor 3 (três), chamada de hiperemia avançada. Quando não eram observados vasos sanguíneos abertos atribuiu-se o valor 0 (zero).

Hemorragia: presente (valor 1) ou ausente (valor 0), caracterizado pela presença de pelo menos 1(uma) hemácia fora do interior dos vasos sanguíneos.

Para as células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) foi estabelecido que quando o número de neutrófilos/linfócitos correspondesse a até 10% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 1(um), chamada de resposta celular inflamatória leve; quando o número de neutrófilos/linfócitos correspondesse entre 10 e 50% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 2 (dois) ou resposta celular inflamatória moderada; e quando o número de neutrófilos/linfócitos correspondesse a mais de 50% atribuiu-se o valor 3 (três), ou seja, resposta celular inflamatória avançada. Para os fibroblastos considerou-se a morfologia celular, onde se verificou a disposição dos mesmos em relação à camada basal do epitélio, observando se os mesmos encontravam-se paralelo ou perpendicularmente organizados. Além disso os espécimes foram avaliados quanto a presença ou ausência de corpo estranho e necrose, este último foi observado através da perda da seletividade tintorial e perda da morfologia celular.

Para a realização da histomorfometria cada lâmina foi fotografada no departamento Ideia-PUCRS, onde inicialmente, padronizou-se o tamanho da ferida cirúrgica de 10 mm, em pixels, para tanto, fotografou-se com um gabarito para que o mesmo fosse a matriz da distância entre os dois pontos da ferida cirúrgica. Para obtenção das fotomicrografias utilizou-se um Estereomicroscópio DF Vasconcellos, equipado com uma objetiva de 300 mm de comprimento focal e com o revólver de aumento na posição 16X, o que corresponde a um aumento de observação de 6,5X. Na observação do processo inflamatório avaliou-se a resposta crônica inflamatória através da presença de centros necróticos, formação de matriz através da proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas.

Foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Kruskal-Wallis para a comparação de mais de dois grupos independentes, em uma análise não-paramétrica. Para análise dos dados obtidos foi constituído um modelo de análise de comparação das médias, onde foi analisado o efeito experimento: comparação entre os grupos experimentais e o controle. Para o efeito tempo, comparação entre os períodos de três, cinco e sete dias; o efeito localização: comparação entre as localizações dos ferimentos.

## Resultados

### **Análise qualitativa dos fatores inflamatórios entre as feridas comparadas intra e inter-grupos controle, irradiados por laser infravermelho e irradiados por laser vermelho**

Realizou-se uma análise descritiva de cada corte histológico correspondente a cada ferimento para se verificar o nível de inflamação e o tipo de infiltrado inflamatório em cada grupo. No grupo

controle observou-se que houve um padrão inflamatório leve nos três períodos avaliados. Observou-se um padrão agudo nos 3 primeiros dias e crônico entre 5 e 7 dias com presença predominantemente de linfócitos nas feridas cranial, medial e caudal. No grupo 2, onde foi aplicado o laser infravermelho (830nm), visualizou-se um padrão inflamatório entre o moderado e avançado nas feridas cranial, medial e caudal, aos 3, 5 e 7 dias. Houve predominância de linfócitos para a ferida cranial, neutrófilos para a ferida medial e linfócitos para a caudal. No grupo 3, onde foi aplicado o laser vermelho (685nm) foi observado um padrão inflamatório leve nos períodos de 3, 5 e 7 dias na ferida cranial, com presença predominante de neutrófilos. Na ferida medial observou-se um padrão equânime de presença de neutrófilos e linfócitos e um nível inflamatório moderado e avançado para os períodos de 3, 5 e 7 dias. Na ferida caudal observou-se maior presença de linfócitos durante os 3, 5 e 7 dias e uma maior presença de processos inflamatórios crônicos, porém, a presença de graus inflamatórios moderados e avançados ocorreram de maneira equânime. Após a realização de cortes histológicos comparou-se os fatores quantitativos e qualitativos entre os grupos controle, laser infravermelho e laser vermelho nos três períodos avaliados. Para o período avaliado de 3 dias nenhuma comparação foi estatisticamente significativa quanto ao fator edema, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos  $p=0.667$ , medial,  $p=0.333$ , caudal,  $p=0.667$ . Para o período de 5 dias não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo o ferimento cranial,  $p=0.352$ , o medial,  $p=0.667$  e o caudal,  $p=0.648$ . No período de 7 dias, também não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial,  $p=0.132$ , medial,  $p=0.352$  e caudal,  $p=0.333$ .

Quando comparou-se o fator hiperemia, no período de 3 dias, nenhuma comparação foi estatisticamente significativa, sendo que, no ferimento cranial obtivemos  $p=0.323$ , no medial  $p=0.570$  e no caudal  $p=0.317$ . No período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, no ferimento cranial,  $p=0.338$ , medial,  $p=0.207$  e caudal,  $p=0.448$ . No período de 7 dias, também não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial,  $p=0.093$ , medial,  $p=0.564$  e caudal  $p=0.338$ . Ao compararmos o fator hemorragia, nenhuma comparação foi estatisticamente significativa entre os três grupos estudados e os três períodos de observação. Ao compararmos o fator grau de inflamação para o período de 3 dias, não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo, visto que, no ferimento cranial obtivemos  $p=0.414$ , medial,  $p=0.136$ , caudal,  $p=0.609$ . No período de 5 dias, também não foi observado nenhum resultado significativo, sendo o ferimento cranial  $p=0.423$ , o medial  $p=0.600$  e o caudal  $p=0.270$ . No período de 7 dias, também não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial  $p=0.238$ , medial  $p=0.406$  e caudal  $p=0.290$ . Ao se comparar tipo de fibroblastos, no período de 3 dias não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo que, no ferimento cranial obteve-se  $p=0.179$ , no medial  $p=0.179$  e no caudal  $p=0.630$ ). Para o período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, sendo o ferimento cranial  $p=0.333$ , o medial  $p=0.333$  e o caudal  $p=0.648$ . Porém no período de 7 dias, observou-se diferença estatística significativa nas comparações das feridas craniais  $p=0.040$  para o laser vermelho, com fibroblastos mais paralelos e não significativa nas regiões medial  $p=0.382$  e caudal  $p=0.167$ . Ao se comparar a presença ou não de corpo estranho, nenhum resultado foi estatisticamente significativo entre os três grupos estudados e os três períodos de observação. O fator necrose, nas comparações de 3 dias, apresentou resultado estatisticamente significativo no grupo laser infravermelho apenas no ferimento caudal  $p=0.022$ , apresentando menor quantidade de necrose que os demais grupos. Nos ferimentos cranial e medial,  $p=0.370$  e  $p=0.333$  respectivamente não apresentaram diferença estatística. No período avaliado de 5 dias

não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo. Para o período de 7 dias, também não observou-se diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial  $p=0.333$ , nas regiões medial  $p=0.370$  e caudal  $p=0.648$ .

#### Análise intra e inter-grupos das medidas histomorfométricas nos grupos controle, irradiação infravermelha e irradiação vermelha

Após análise entre os grupos, apenas da ferida cranial, não houve diferenças significativas entre as medidas dos bordos das feridas após os períodos de cicatrização em análise. Entretanto, houve diferença entre o 3° e o 7° dia relativo ao tamanho da ferida. Ao compararmos as feridas cranial e caudal, desconsiderando o efeito tempo, não observamos diferenças nos tempos de cicatrização, bem como não foi observada diferença significativa propiciada pela distância entre uma ferida e outra. Ao analisarmos separadamente, em cada grupo, a ferida cranial e caudal, observamos que no grupo controle o resultado não foi estatisticamente significativo ( $p=0.732$ ); no grupo infravermelho não foi estatisticamente significativo, mas pode ter havido uma interação ( $p=0.092$ ), e no grupo com laser vermelho o resultado também não apresentou diferença significativa ( $p=0.846$ ).

Ao considerarmos o efeito tempo no grupo controle não observamos diferença estatisticamente significativa no grupo avaliado durante o período de 3 dias ( $p=0.155$ ), 5 dias ( $p=0.443$ ) e 7 dias ( $p=0.959$ ). No grupo irradiado com laser infravermelho, não observamos diferença entre as medidas em 3 dias ( $p=0.208$ ), 5 dias ( $p=0.974$ ) e 7 dias ( $p=0.183$ ). No grupo irradiado com laser vermelho não encontramos diferença estatisticamente significativa no tempo em 3 dias ( $p=0.243$ ), encontramos diferença estatisticamente significativa no período de 5 dias ( $p=0.016$ ) e não significativa no período de 7 dias ( $p=0.972$ ). Gráficos 1, 2 e 3.

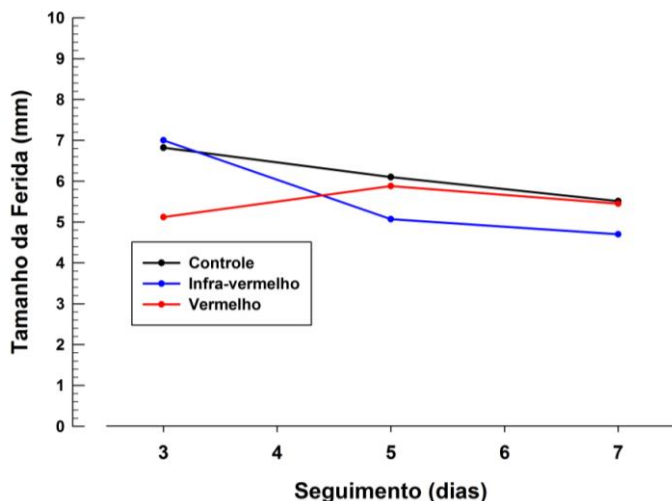


Gráfico 1: comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região cranial

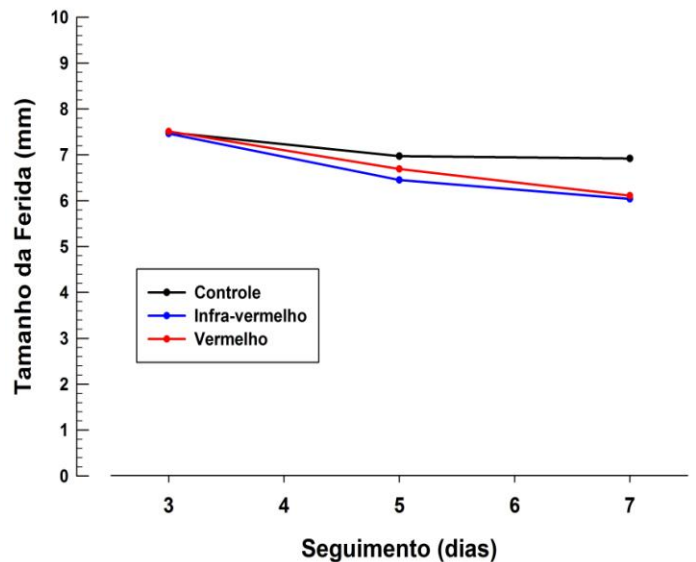


Gráfico 2: comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região medial

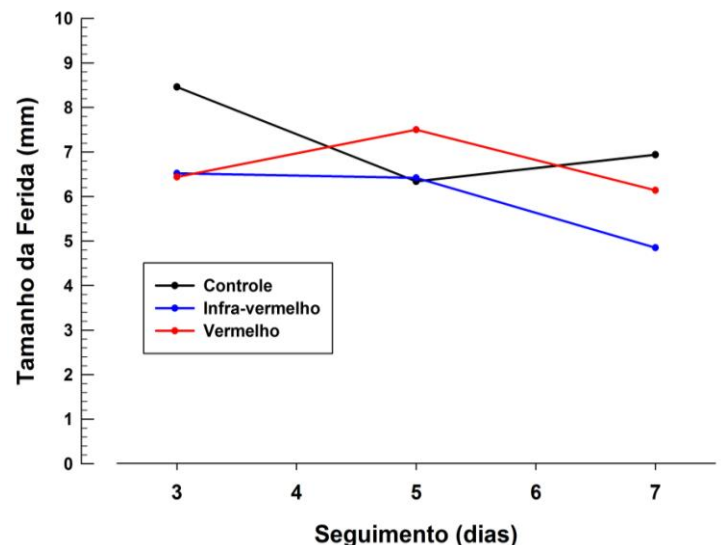


Gráfico 3: comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região caudal

#### Comparações das medidas histomorfométricas das feridas craniais vs. caudais intra e inter-grupos irradiados com laser infravermelho e laser vermelho

Quando comparamos os valores das medidas histomorfométricas, entre os bordos das feridas irradiadas pelo laser infravermelho com as irradiadas pelo laser vermelho no período de 3 dias, não foi encontrado diferença significativa, respectivamente com  $p=0.956$  e  $p=0.909$ .

Quando analisamos o período de 5 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre as feridas cranial vs. caudal, respectivamente  $p=0.643$  e  $p=0.075$ , porém este valor pode

sugerir uma interação. Após os 7 dias também não houve diferença estatisticamente significante, com  $p=0.848$  e  $p=0.185$ . Entre os grupos as comparações entre o tamanho das feridas cranial e caudal não apresentaram diferenças estatísticas na redução de seu tamanho. Quando se avaliou o tamanho da redução da ferida entre os grupos não houve diferença significativa,  $p=0.254$ , bem como entre os tempos,  $p=0.652$ . Não houve interação entre os grupos vs. dias, mostrando que independe do laser aplicado e do tempo, com  $p=0.095$ . Portanto, para o tempo utilizado neste estudo não foi possível observar alterações significativas entre as medidas craniais e caudais. A tabela 1 apresenta as médias das medidas histomorfométricas de todos os grupos.

Tabela 1: Médias das medidas histomorfométricas (mm) entre as bordas das feridas nos grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 dias.

| Dias   | G1      |         |         | G2      |         |         | G3      |         |         |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|        | cranial | medial  | caudal  | cranial | medial  | caudal  | cranial | medial  | caudal  |
| 3 dias | 6.8±1.8 | 7.5±1.4 | 8.5±2.1 | 7.5±1.0 | 7.0±1.2 | 6.5±1.3 | 5.1±0.3 | 7.5±1.6 | 6.4±0.9 |
| 5 dias | 6.1±0.8 | 6.9±0.8 | 6.3±1.5 | 6.4±1.0 | 5.0±0.7 | 6.4±1.1 | 5.8±0.4 | 6.7±0.3 | 7.5±0.3 |
| 7 dias | 6.1±1.3 | 6.9±1.1 | 6.9±0.8 | 6.0±0.7 | 4.7±1.2 | 4.8±0.9 | 5.4±1.7 | 6.1±0.4 | 6.1±1.7 |

G1:grupo controle; G2:laser infravermelho; G3:laser vermelho; os valores estão expressos em média e desvio padrão.

## Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito local e à distância da fototerapia por laser infravermelho (830 nm) e vermelho (685 nm) em feridas no dorso de ratos. Este estudo foi desenvolvido e conduzido de acordo com os princípios e paradigmas bioéticos preconizados e aceitos mundialmente, bem como o número de animais utilizados foi limitado a 15 animais por grupo, sendo 5 animais em cada subgrupo. Os achados no presente estudo não demonstraram que a irradiação com doses de  $8 \text{ J/cm}^2$  possibilite uma associação positiva na redução das distâncias entre as bordas das feridas nos grupos irradiados no modelo animal rato, corroborando os achados de LOWE *et al.*, 1990; WALKER *et al.*, 2000.

Obteve-se, ainda, na literatura, que os resultados se mostram muito contraditórios quando são analisadas as propriedades do laser de baixa potência, bem como, o seu efeito bioestimulatório ou inibitório, devendo haver cuidado nas interpretações dos resultados obtidos (LAGAN *et al.*, 2002). Essa questão é a grande limitação dos estudos sobre a aplicabilidade do laser e também foi em nossa pesquisa, pois existem uma variabilidade dos comprimentos de onda utilizados, diferentes potências, doses e tempos de análise, o que dificultam na replicabilidade dos estudos. Portanto, para se atestar as possibilidades de biomodulação propiciadas pela terapia a laser, tanto local quanto à distância, vários fatores devem ser levados em consideração (WHINFIELD e AITKENHEAD, 2009).

Neste estudo optou-se pela aplicação do laser na região cranial, por ser mais inervada e vascularizada, com o objetivo de se obter um maior estímulo em sua cicatrização. Assim, poderia induzir uma maior biomodulação local e à distância nas feridas mediais e caudais, porém, este efeito não foi significativo quando comparados os valores das medidas inter-grupos. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao período de cicatrização ou à formação de crosta. Durante o período de observação, nenhuma

ferida apresentou sinais de infecção. O exame histológico também não mostrou diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e as não tratadas, bem como, não evidenciou que o uso de LLLT poderia melhorar o processo de cicatrização de feridas (ANNERTH, HALL e RYDEN, 1988).

Observamos maior quantidade de edema e hiperemia em estágios moderados e avançados promovidos pela laserterapia vermelha, isto posto podemos sugerir que o maior comprimento de onda do laser infravermelho age nas camadas mais profundas atingindo, com maior intensidade no tecido conjuntivo comparativamente ao laser vermelho, que possui menor comprimento de onda (MENDEZ *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2009). A deposição de colágeno nos 3 e 5 primeiros dias ocorreu de maneira irregular e nas camadas mais profundas do tecido conjuntivo, contrapondo-se aos outros resultados, onde a conclusão foi de que as lesões irradiadas apresentaram reepitelização acelerada quando comparadas com o grupo controle (ARAÚJO *et al.*, 2007). Em nosso estudo, ao encontro de outros trabalhos como Rodrigo *et al* (2009) e Matic *et al* (2009), foi observada uma redução da distância entre os bordos das feridas nos intervalos dos períodos entre 3 e 7 dias, no grupo irradiado por laser infravermelho (830 nm), comparado ao laser vermelho (685 nm). As doses utilizadas em nosso estudo foram preconizadas em  $8 \text{ J/cm}^2$ , de acordo com estudos clássicos que preconizaram o intervalo entre  $1-50 \text{ J/cm}^2$  e de acordo com a variação das densidades de energia preconizadas anteriormente (PEREIRA *et al.*, 2002). O uso de diferentes doses se deve ao fato de que, até o presente momento, não existe uma definição clara e definitiva que aponte a dosimetria hábil a uma melhor dose-resposta tecidual, fato este que revela a necessidade de futuras investigações.

A terapia fotodinâmica por laser de baixa potência apresenta inúmeras indicações e aplicações, mostrado por vários estudos prévios, apesar dos resultados ainda contraditórios presentes na literatura. As razões são diversas, pois envolvem variações nos períodos de tempo avaliados, área irradiada e frequência, tipo de laser irradiado (pulsátil ou contínuo) e diferentes modelos animais estudados (BAYAT, AZARI e GOLMOHAMMADI, 2007).

Estudos futuros devem ser realizados com o intuito de se verificar o real mecanismo que envolve a cicatrização de feridas em modelo animal e em seres humanos. Isto envolve um complexo mecanismo de reação tecidual, resultante da absorção do laser emitido sob determinadas doses e a seqüência de eventos que envolvem todos os processos bioquímicos altamente complexos. Portanto, se faz necessário que equipes de diferentes especialidades estejam envolvidas neste processo de análises descritiva, qualitativa e quantitativa, relacionados à biologia celular, para, assim, nortear-se um protocolo onde a laserterapia poderá agir de modo mais eficiente e eficaz.

## Conclusões

A fototerapia por laser de baixa potência, com comprimento de onda vermelho e infravermelho nos parâmetros avaliados, apesar de diferenças estatísticas pontuais, não apresentou efeito biomodulatório diferente do grupo controle.

Neste estudo tanto a aplicação do laser vermelho como infravermelho não demonstrou diferença na redução quantitativa nos tamanhos das feridas durante os períodos de cicatrização analisados. Isto posto, podemos supor que a ausência de significância estatística pode ser resultante da pequena amostra e períodos mais longos devem ser propostos. Contudo, análises futuras através de marcadores bioquímicos podem elucidar melhor as possíveis diferenças entre os estágios agudos e crônicos e assim elucidar seu efeito clínico.

## Referências

ANNERTH, G.; HALL, G.; RYDEN, H. The effect of low-energy infrared laser radiation on wound healing in rats. **Br J Oral and Maxillofac Surg**, v.26, n.1, p.12-17, Feb. 1988.

ARAÚJO, C.E. *et al.* Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **J Photochem Photobiol A Chem**. v.86, n.2, p.87-96, Feb. 2007.

BAYAT, M.; AZARI, A.; GOLMOHAMMADI, M. G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. **Photomed Las Surg**. v.28, n.4, p.465-470, 2010.

BRAIMAN-WIKSMAN, L. *et al.* Novel insights into wound healing sequence of events. **Toxicologic Pathology**. v.35, n.6, p.767-779, Oct. 2007.

CHOW, R.T.; BARNESLEY, L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. **Lasers Surg Med**. v.37, n.1, p.46-52, Jul. 2005.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**. v.23, n.2, p.37-42, 2005.

**HENRIQUES, A.C.G.; CAZAL, C.; DE CASTRO, J.F.L. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. Rev. Col. Bras. Cir. [online]. ISSN 0100-6991, v.37, n.4, p.295-302, 2010.**

LAGAN, K.M. *et al.* Low-intensity laser therapy/combined phototherapy in the management of chronic venous ulceration: a placebo-controlled study. **J Clin Laser Med Surg**. v.20, n.3, p.109-116, Jun. 2002.

LOWE, A.S. *et al.* Effect of low-intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med** v.23, n.5, p.291-298, 1998.

MATIC, M. *et al.* Influence of different types of electromagnetic fields on skin reparatory processes in experimental animals. **Lasers Med Sci**. v.24, p.321-327, 2009.

MEDRADO, A.R. *et al.* Influence of low-laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med**. v.32, n.3, p.239-244, 2003.

MENDEZ, T.M. *et al.* Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **J. Clin. Laser Med. Surg**. v.22, n.1, p.19-25, Feb. 2004.

NASCIMENTO, P.M. *et al.* 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. **Photomed. Laser Surg**. v.22, p.513-518, 2004.

PEREIRA, A.N. *et al.* Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblast. **Lasers Surg med**. v.31, n.4, p.263-267, Oct. 2002.

RODRIGO, S.M. *et al.* Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg**. v.27, n.6, p.929-935, 2009.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power Laser irradiation on suture during bone regeneration in midpalatal expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. v.111, n.5, p.525-532, May 1997.

WALKER, M.D. *et al.* Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med**. v.26, n.1, p.41-47, 2000.

WHINFIELD, A.L.; AITKENHEAD, I. The light revival: does phototherapy promote wound healing? A review. **Foot**. v.19, n.2, p.117-124, Jun 2009.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, pela viabilização dos recursos financeiros.