DANIEL ZUCCHI LIBANORE

Efeitos da Terapia a Laser de Baixa Intensidade (685 e 830nm) na Taxa de Proliferação Bacteriana e na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Modelo Animal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia-Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos da obtenção do Título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

São Carlos
2008

Ficha Catalográfica

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Libanore, Daniel Zucchi

L694e Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de ferida cutâneas em modelo animal / Daniel Zucchi Libanore ; orientador Marco Andrey Cipriani Frade. — São Carlos, 2008.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades : Bioengenharia) — Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.

1. Laser terapêutico. 2. Terapia a laser de baixa intensidade. 3. Crescimento bacteriano. 4. Úlceras de perna. 5. Modelo animal. 6. Cicatrização I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sidnei e Márcia, minha irmã Mariana e minha sobrinha Cecília e à minha namorada Vera. Muito obrigado a todos pela paciência e compreensão durante mais esta jornada de minha vida.

Agradecimentos

À Deus por sempre iluminar meu caminho e colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade pela capacidade, paciência, conhecimento e acima de tudo por sua amizade. Meu sincero Obrigado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador por toda sua amizade, seu conhecimento e ajuda disponibilizando seu laboratório para elaboração dos experimentos.

A empresa DMC de São Carlos, e em especial a Prof. Dra. Luciana Almeida Lopes pelo empréstimo do aparelho laser utilizado nesse experimento.

Aos técnicos do biotério do Departamento de Clínica Médica, Adalberto, Mauricio e Roni, por cuidarem dos animais durante os experimentos.

Agradecimento especial a Daniela dos Santos Masson pela colaboração nos experimentos e acima de tudo por sua amizade.

Agradeço a toda minha família, avós, tios, tias e primos por toda paciência, compreensão e amor por eles disponibilizado. Obrigado.

Agradeço meu primo Fausto Antonio Miguel Libanore, que além de amigo de tantas batalhas, me ensina todos os dias que nós devemos viver intensamente e nunca desistirmos de nada.

Aos amigos de orientação, Saulo, Tiago, Luisiane, Débora e em especial à Fernanda, que mesmo longe sempre será lembrada como uma grande amiga.

A duas pessoas especiais, meus irmãos de coração, Pedro Paulo Chaves de Souza e Raphael Freitas de Souza. Muito obrigado, mesmo.

Epígrafe

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram.

Olhes para trás ... mas vá em frente

pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charlie Chaplin

Resumo

LIBANORE D.Z. **Efeitos da Terapia a Laser de Baixa intensidade (685 e 830nm) na Taxa de Proliferação Bacteriana e na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Modelo Animal**, 2008, 94f Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Introdução: Recursos fisioterapêuticos tem sido utilizados no tratamento de úlceras de perna como a terapia a laser de baixa intensidade. A contaminação bacteriana dessas úlceras é freqüente constituindo-se numa importante complicação da cicatrização. Assim, busca-se investigar os efeitos dessa terapêutica frente às culturas de diferentes espécies bacterianas *in vitro* e *in vivo*.

Material e Métodos: Utilizou-se aparelho laser modelo Theralase III- DMC (685 e 830nm) e diferentes doses (1, 2 e 4J). Foram utilizados bactérias, *S. aureus* ATCC 6538 (Gram+) e *P. aeruginosa* ATCC 15442(Gram-), reativadas em B.H.I. Agar inclinado a 37° C/24h. Após as bactérias foram re-suspensas em B.H.I. caldo/37°C/20h, centrifugadas 3x/15min/ 4.500rpm, seguida de lavagens e homogeneização. A suspensão foi diluída em placas de cultura celular de 96 poços, submetidas a diluições seriadas sucessivas, encontrando as diluições ideais de 10^{-12} bactérias/ml para *S. Aureus* e 10^{-15} bactéria/ml para *P. Aeruginosa*. As soluções bacterianas foram irradiadas com laser de diferentes comprimentos de onda (685e 830nm) e diferentes doses (1, 2 e 4J). Dez micro litros da solução bacteriana do último poço foram semeados em placa de petri nos meios Mc Conkey Agar e B.H.I.-Agar bactérias Gram positiva e negativa respectivamente para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (U.F.C.'s.). Foram semeadas 10 placas para cada dose de diferente comprimento de onda e espécie bacteriana diferente e 10 placas para o grupo controle, ou seja, sem irradiação laser. Nos estudos *in vivo*, foram utilizados coelhos, machos, neozelandeses pesando aproximadamente 1,5Kg. A anestesia foi feita com 1,5ml/ animal de ketamina 100mg e xylzina 1,0ml/ animal. Foram feitas 6 feridas de 6mm de diâmetro (punch) em cada orelha, constituindo-se cada animal, um grupo (n=12). As feridas foram previamente contaminadas com *S. Aureus* (G+) e *P. Aeruginosa* (G-). Os animais foram divididos em Grupo 1(laser 685nm + G+), Grupo2(laser 830nm + G+), Grupo 3(laser 685nm + G-), Grupo 4(laser 830nm + G-), Grupo 5 (apenas laser 685nm), Grupo 6(apenas laser 830nm), Grupo 7(lasers 685 e 830nm + G-), Grupo 8(lasers 685 e 830nm + G+). As úlceras foram fotografadas nos tempos de 24h, 3dias, 7dias, 10dias, 13 dias e 16 dias e posteriormente analisadas com programa Image J®, realizadas pelo mesmo indivíduo. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e pós-teste de Bonferroni para múltiplas amostras não paramétricas. **Resultados:** No experimento *in vitro* foi observado que todas as doses laser utilizadas tiveram efeito inibitório no crescimento bacteriano em ambas as espécies, sendo esse efeito maior na dose de 4J/cm², nos diferentes comprimentos de onda utilizados (685nm e 830nm), mesmo quando esses foram usados de forma consecutiva. *In vivo*, observou-se que no 3° dia pós cirúrgico houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 6. No 7° dia a diferença estatística aconteceu entre os grupos 1 e 4. No 10° dia não

houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas dos grupos. No 13º dia observou-se diferença estatística entre todos os grupos quando comparados com os grupos 7 e 8 (lasers 685 e 830nm + G⁺). No 16º de seguimento todas as feridas encontravam-se cicatrizadas. **Conclusão:** A terapia a laser de baixa intensidade apresentou efeito inibitório do crescimento bacteriano *in vitro* e nos estudos *in vivo*, mostrando-se capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas, mesmo contaminadas com diferentes espécies bacterianas.

Palavras Chave: Terapia a laser de baixa intensidade, crescimento bacteriano, úlceras de perna, modelo animal, cicatrização.

Abstract

LIBANORE D.Z. ***Effects of Low-Level Laser Therapy (685nm and 830nm) in Bacterial Growth and Wound Healing in Animal Models***, 2008, Master Dissertation, Programa de Pós-Graduação da Bioengenharia, University of São Paulo at São Carlos

Introduction: Physical therapeutic resources have been used to treat leg ulcers, such as laser therapy of low intensity. Bacterial contamination of these ulcers often constitutes itself into a major complication of healing. Thus, search up to investigate the effects of this therapy off the cultures of different bacterial species *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** It was used laser device model Theralase III-DMC (685 and 830nm) in different doses (1, 2 and 4J). It was used bacteria *S. aureus* ATCC 6538 (Gram⁺) and *P. aeruginosa* ATCC 15442 (Gram⁻), reactivated in tilted BHI-Agar to 37°C/24h. After the bacteria were re-suspended in broth B.H.I. to 37°C for 20h, centrifuged 3x/15min/4.500rpm, followed by washing and homogenization. The suspension was diluted in 96 wells cell culture plates, and submitted to successive serial dilutions, finding the ideas dilutions of 10⁻¹² bacteria / ml for *S.aureus* and 10⁻¹⁵ bacteria/ml for *P.aeruginosa*. The bacterial solutions were irradiated with different wavelength of laser (685e 830nm) and different doses (1, 2 and 4J). Ten microliters of bacterial solution from the last well were sowed in Petri's plate with Mc Conkey agar and BHI-agar to bacterias Gram positive and negative respectively for further counting of colony forming units (CFU's). Ten plates for each dose of different wavelength and different bacterial species were sowed and 10 boards for the control group, without laser irradiation. In the *in vivo* studies were used New Zealand male rabbits, weighing approximately 1.5 kg. Anesthesia was made with 1.5 ml of ketamine 100mg and xylzina 1.0 ml / animal. Six punched wounds were made in each ear, and each animal constituted a group (n = 12). The wounds were previously contaminated with *S. aureus* (G⁺) and *P. aeruginosa* (G⁻). The animals were divided in Group 1 (laser 685nm + G⁺), Grupo 2 (830nm laser + G⁺), Group 3 (laser 685nm + G⁻), Group 4 (laser 830nm + G⁻), Group 5 (only laser 685nm), Group 6 (only laser 830nm), Group 7 (lasers 685 and 830nm + G⁻), Group 8 (lasers 685 and 830nm + G⁺). The ulcers were photographed in times of 24 hours, 3, 7, 10, 13 and 16 days and then analyzed with Image J[®] software, conducted by the same individual. The results were analyzed by non parametric ANOVA statistical test and post-test for multiple samples by Bonferroni's test. **Results:** In the *in vitro* experiments was observed that all the laser doses used presented an inhibitory effect on bacterial growth in both species, and this effect was greater using the dose of 4J in different wavelengths (685nm, 830nm), even when these were applied consecutively. *In vivo*, it was observed that in the 3rd day after surgery there was a statistically significant difference between groups 1 and 6. In the 7th day happened to statistical difference between groups 1 and 4. In the 10th day there was no statistically

significant difference among the areas of groups. In the 13th day there was statistical difference between all groups when compared with groups 7 and 8 (685 and 830nm lasers + G⁺). In the 16th to follow all the wounds had been healed.

Conclusion: The laser therapy of low intensity showed inhibitory effect of bacterial growth *in vitro* and *in vivo* studies and it were able to accelerate the wound healing, even contaminated with different bacterial species.

Key Words: Low-level laser therapy; bacterial growth; leg ulcers; models,

Animal; wound healing

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Espectro da Luz Laser	26
2	Desenho esquemático do experimento <i>in vitro</i> .	41
3	Esquema da Irradiação laser em Placa de Microtitulação	42
4	Esquema da quantificação das UFCs em Placa de Petri	43
5	Esquema ilustrativo do experimento <i>in vitro</i>	44
6	Equipamento laser	45
7	Esquema ilustrativo do modelo de ferida em orelha de coelho.	46
8	Esquema ilustrativo do experimento <i>in vivo</i> .	50
9	Esquema ilustrativo da utilização do software Image J	51
10	Avaliação da terapia laser de baixa intensidade (685nm) na taxa de crescimento bacteriano em bactérias <i>S.Aureus</i> .	52
11	Avaliação da terapia laser de baixa intensidade (830nm) na taxa de crescimento bacteriano em bactérias <i>S.Aureus</i> .	53
12	Avaliação da terapia laser de baixa intensidade (685nm) na taxa de crescimento bacteriano em bactérias <i>P. Aeruginosa</i>	53
13	Avaliação da terapia laser de baixa intensidade (830nm) na taxa de crescimento bacteriano em bactérias <i>P. Aeruginosa</i>	54
14	Análise comparativa da influência dos diferentes comprimentos de onda (685nm e 830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>S. aureus</i> na dose de 4J/cm ² .	54
15	Análise comparativa da influência dos	55

	diferentes comprimentos de onda (685nm e 830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>P. aeruginosa</i> na dose de 4J/cm ² .	
16	Influência dos comprimentos de onda aplicados isolada (685nm e 830nm) e sucessivamente (685/830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) de <i>S. aureus</i> na dose de 4J	56
17	Análise comparativa da influência dos diferentes comprimentos de onda (685nm e 830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>P. aeruginosa</i> na dose de 2J/cm ² .	57
18	Análise comparativa da influência dos diferentes comprimentos de onda (685nm e 830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>P. aeruginosa</i> na dose de 4J/cm ² .	58
19	Tabela dos resultados do experimento in vitro em porcentagem	58
20	Análise da área das úlceras/cm ² no período de 3 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J/cm ²	60
21	Análise da área das úlceras/cm ² no período de 7 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J/cm ²	61
22	Análise da área das úlceras/cm ² no período de 10 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J/cm ²	62
23	Análise da área das úlceras/cm ² no período de 13 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J/cm ²	62

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Abreviatiras e siglas

Lista de Gráficos

Introdução 15

Cicatrização..... 17

Injúria..... 18

Coagulação 18

Inflamação..... 19

Formação Tecidual..... 20

Remodelagem Tecidual..... 22

Terapia a Laser de Baixa Intensidade 25

Terapia a laser *In vitro*..... 28

Terapia a laser *In vivo* 31

Terapia a laser em humanos 34

Justificativa..... 37

Objetivos 39

Materiais e Métodos 40

Estudo Bacteriológico..... 40

Obtenção e Armazenagem das Bactérias 40

Cultura, Diluição e Plaqueamento	40
Protocolo de Estimulação a Laser e Semeadura	41
Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias	42
Equipamento	43
Estudo da Cicatrização em Modelo Animal	43
Seleção dos animais	43
Ato Anestésico	45
Ato cirúrgico	45
Padronização dos grupos e tempos de avaliação	46
Análise clínico – fotográfica.....	48
Análise dos resultados	49
Resultados	50
Resultados <i>in vitro</i>	50
Resultados <i>In vivo</i>	59
Discussão.....	64
Conclusão	72
Referências Bibliográficas.....	73
Anexos	77

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento na expectativa de vida da população mundial aumentaram-se também as doenças crônico-degenerativas, dentre elas as úlceras crônicas. No campo da fisioterapia, inúmeros indivíduos são encaminhados todos os anos para tratamento de problemas traumato-ortopédicos e neurológicos incapacitantes associados a lesões da pele conhecidas como úlceras de decúbito ou úlceras de pressão, conseqüentes de uma irrigação sangüínea deficitária causada por aumento da pressão exercida pelo próprio peso do corpo do paciente sobre o leito em determinada região. (DIEGELMAN et al., 2004).

As úlceras cutâneas podem ser definidas como uma perda circunscrita ou irregular do tegumento (epiderme e/ou derme), podendo atingir subcutâneo e tecidos subjacentes. (CARVALHO et al., 2000).

A etiologia das úlceras cutâneas é multifatorial, sendo inúmeros os fatores de risco que predispõe ao aparecimento desse tipo de lesão como: a oxigenação prejudicada em decorrência da diminuição da perfusão tissular, a fragilidade tecidual, a duração da pressão e enfermidades metabólicas como diabetes mellitus e hipotireoidismos. Pode-se considerar também, as lesões dérmicas associadas a enfermidades que levam o indivíduo a longos períodos de permanência no leito, como, trauma-raquimedular, acidente vascular encefálico, déficit motor, status nutricional, comprometimento da percepção sensorial e/ou cognição e aumento da umidade, sendo mais comum, em regiões de proeminências ósseas como, por exemplo, calcâneo, trocânter femural e sacro. (DIEGELMAN et al., 2004 ; BROUGHTON et al., 2006).

A evolução de uma úlcera de pressão pode ser dividida em quatro estágios, estabelecidos principalmente pelas características clínicas da pele e pela profundidade da agressão tissular, a saber:

- **Estágio I:** manifesta-se por um rubor na pele intacta do indivíduo o que demonstra agressão dérmica e epidérmica, porém não definitiva, pois o rubor desaparece quando a pressão é aliviada indicando, portanto, uma microcirculação intacta. Nesse estágio faz-se importante realizar intervenção preventiva, tal como correção do posicionamento do paciente, sua higiene ou alívio da força de cisalhamento.
- **Estágio II:** ocorre lesão vascular em tecidos superficiais e conseqüentemente, lesão subcutânea com pequena destruição de derme e epiderme associada a rubor e edema que não desaparecem e formação de vesículas, abrasão e ulceração superficial. A pele circunvizinha está vermelha ou escurecida. A úlcera é dolorosa, porque os terminais de nervos da camada dermal estão expostos. Neste estágio a cicatrização pode ocorrer com terapia local e intervenção para excluir o fator causal.
- **Estágio III:** ocorre destruição das camadas subcutâneas com grande cavidade focal, presença de células necróticas e destruição do leito capilar subjacente.
- **Estágio IV:** ocorre destruição avançada de capilares subcutâneos, fáscias e massa muscular, com úlceras extensas, podendo ocorrer exposição dos ossos adjacentes com tecido necrótico, comprometimento infeccioso e de

drenagem. O risco para complicações, tais como septicemia ou osteomielite é muito alto (POTTER; PERRI, 2002; SHAI; MAIBACH, 2005).

É comum que o primeiro e o segundo estágio da ulceração aconteçam em leitos hospitalares ou domiciliares, em virtude da permanência dos pacientes, em apenas um decúbito, por longos períodos. Mesmo com o empenho de enfermeiros e fisioterapeutas na mudança de decúbito desses pacientes, o surgimento dos focos de ulceração passa a ser uma questão de tempo. Caso o quadro evolua para ulceração, o enfermeiro prioriza a limpeza do local com o objetivo de remover exsudato e resíduos metabólicos. Para isto o enfermeiro utiliza-se soro fisiológico em jatos, de preferência, morno para não resfriar os tecidos que se encontram em granulação. A limpeza deve ser feita de forma a não promover o trauma mecânico ou químico prevenindo a lesão como cuidado de não lesar os tecidos viáveis.

1.1 Cicatrização

O processo de cicatrização é uma seqüência de eventos que envolvem mecanismos moleculares e celulares onde o objetivo principal é restaurar o tecido que sofreu a injúria. No entanto, o reparo de lesão após o nascimento acontecerá com a formação de cicatriz, fibrose ou contração desse tecido lesado. O processo de cicatrização, sem a formação de cicatriz, com substituição do tecido lesado por tecido neoformado, apenas acontecerá na fase fetal (TURAN et al., 2004).

A cicatrização de feridas envolve cinco fases sequenciais: **injúria, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual**. Cada fase, embora distinta didaticamente, ocorre superposta e envolve elementos celulares e/ou extracelulares tais como citocinas e fatores de crescimento que são substâncias

com a função de induzir a proliferação e a quimiotaxia de certas células para que ocorra deposição de matriz extracelular e subsequente formação tecidual, além de organizar de forma seqüencial todo o processo (CHATTIBI; FERGUSON, 1999; BEANES et al., 2003).

1.1.1 – Injúria

Nesta primeira fase ocorre a lesão tecidual e subsequente extravasamento de sangue e elementos celulares como plaquetas e plasma pelo local do vaso lesado. aminas vasoativas e outros mediadores aumentam a permeabilidade capilar com liberação de fibrinogênio e fibronectina, além da liberação de monócitos, linfócitos e macrófagos, para o sitio da lesão. Esses fenômenos acontecem devido à interação dinâmica de citocinas e fatores liberados pelas células, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação de crescimento beta e alfa (TGF β e TGF α), sendo, essas células, responsáveis pela síntese de matriz extracelular (BEANES *et al.*, 2003; CHATTIBI; FERGUSON, 1999).

1.1.2 - Coagulação

A fase de coagulação é a segunda fase no processo de cicatrização das lesões e ocorre logo após a injúria tecidual. Nessa fase as plaquetas coaguladas e os coágulos de fibrina iniciam a cascata de ativação da coagulação onde as plaquetas, ativadas por trombinas, induzem a liberação de PDGF, TGF β e TGF α além de fatores de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e fatores plaquetários IV (BEANES *et al.*, 2003; KARUKONDA *et*

al., 2000). Os coágulos de fibrina atuam como matriz para colonização por células inflamatórias no local da lesão, atraídos por quimiotaxia pela ação de PDGF e TGF α , constituído especialmente de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, sendo este último importante pois fará a limpeza, do local da lesão, por meio de fagocitose retirando restos celulares e possíveis agentes contaminantes (BEANES *et al.*, 2003; KARUKONDA *et al.*, 2000).

Além dos coágulos de fibrina e plaquetas coaguladas, a matriz extracelular provisória, também é composta por outras glicoproteínas como, fibronectina, vitronectina e trombospondim e o fator de Von Willebrand (fator VIII), importantes para ocuparem todos os espaços causados pela lesão (SHAI; MAIBACH, 2005).

1.1.3 – Inflamação

Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a migrarem para o local da lesão, atraídos por fatores de crescimento liberados durante a fase de coagulação, tais como fragmentos de fibronectina e trombina e produtos de degradação de matriz extracelular de fragmentos de colágeno. As selectinas, receptores presentes na superfície das células endoteliais, juntamente com as integrinas, receptores presentes na superfície dos neutrófilos, ajudam essas células inflamatórias a aderirem à parede do vaso e assim fazerem a fuga, para o meio extracelular, que também acontece devido ao aumento da permeabilidade vascular induzida por histamina e prostaglandinas. A interação das selectina com as integrinas é essencial para que ocorra a marginação dos linfócitos.

A fase de inflamação se inicia num período de 1 a 5 dias após a injúria, onde monócitos que estão aderidos à matriz se transformam em macrófagos, que são importantes por fazerem a descontaminação e o desbridamento do local da lesão, fazendo a síntese de matriz extracelular e liberando citocinas essenciais para o processo cicatricial. Nessa fase do processo de cicatrização as citocinas, derivadas principalmente de macrófagos, são PDGF, TGF α , FGF (fator de crescimento de fibroblastos), (ILGF) *insuline like growth factor*, TGF β , interleucinas 1 (IL1), EGF e TNF α (fator de necrose tumoral). Esses fatores de crescimento e citocinas regulam a produção e organização da matriz extracelular feita por fibroblastos e a proliferação de células musculares lisas e células endoteliais necessárias para que ocorra a angiogenese (CHATTIBI; FERGUSON, 1999; SINGER; CLARK, 1999; BEANES *et al.*, 2003).

1.1.4 - Formação Tecidual

A quarta fase do processo de cicatrização de feridas acontece 3 dias após a injúria com a função de restabelecer a integridade da derme e epiderme no sítio da lesão e é marcada pelo aparecimento e dominância dos fibroblastos que liberaram, predominantemente, colágeno tipo I e III. Tão importante quanto a epitelização nessa fase, é a granulação tecidual, que é gerada pelos capilares neoformados. Esses capilares neoformados serão importantes por levarem oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular e para a neoformação tecidual. Assim, o processo de granulação ocorre como consequência da ativação de mecanismos de fibroplasia e angiogenese (BEANES *et al.*, 2003).

Macrófagos e fibroblastos são elementos importantes nessa fase e desempenham funções distintas no local da lesão. Os macrófagos, além de fazerem o debridamento e a descontaminação da ferida, liberam citocinas que são importantes para a fibroplasia e a angiogênese, enquanto que os fibroblastos atuam na construção de uma nova matriz extracelular que dará suporte para a chegada de novas células importantes para o reparo tecidual.

Os fibroblastos, uma vez no interior das feridas, atraídos quimiotaticamente por fatores de crescimento como PDGF, fator básico de crescimento (bFGF) e TGF β , sintetizam colágeno, especialmente tipo III, iniciando o processo de restauração da pele lesada. A grande produção de colágeno, nessa fase, pode ser explicada pela expressão de TGF β que também pode ser responsável pela contração da cicatriz juntamente com os miofibroblastos (SHAI; MAIBACH, 2005; KARUKONDA *et al*, 2000; LI *et al*, 2007)

No caso da angiogênese, trata-se de um fenômeno complexo de formação de novos vasos por vasos sangüíneos já formados. Envolve uma série de mecanismos complexos, como ativação local das células endoteliais, proliferação tecidual, formação de uma estrutura tubular e reconstrução da membrana basal. A formação de novos vasos depende de matriz extracelular local para que essa sirva de suporte para as células endoteliais poderem migrar para o local da lesão. Um dos componentes da matriz extracelular mais importante na formação de novos vasos sangüíneos é a laminina. Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos nesse processo como: FGF (β e α), EGF, TGF α , PDGF, TGF β , VEGF (fator do crescimento do endotélio vascular), dentre outros, sendo este último o

mais importante na formação desses novos vasos (ARNOLD; WEST, 1991; LI *et al*, 2007).

1.1.5 - Remodelagem tecidual

Essa fase representa o evento mais tardio da cicatrização de feridas, onde há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. Há um equilíbrio na deposição de colágeno novo e a lise de colágeno velho que acontece devido à ação das collagenases. Com o passar do tempo, o colágeno predominantemente tipo III, será substituído por colágeno tipo I. Os macrófagos começam a desaparecer juntamente com a diminuição da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. A matriz extracelular é remodelada por metaloproteinases que incluem collagenases intersticiais, collagenases tipo IV e gelatinases. A ação das metaloproteinases na degradação de colágeno pode ser estimulada por estresse biomecânico ou aumento da tensão das fibras de colágeno. Os principais fatores de crescimento envolvidos nessa fase são TNF α , PDGF e TGF β , esses produzidos por fibroblastos, EGF e TGF β que são produzidos por células endoteliais (KARUKONDA *et al*, 2000; BEANES *et al.*, 2003; LI *et al*, 2007)

No entanto, uma complicação constante das úlceras crônicas é a infecção bacteriana secundária onde, freqüentemente, podem ser encontradas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas que atraem leucócitos, liberando enzimas como a mieloperoxidase, diminuindo a quantidade de oxigênio nos tecidos, resultando em uma isquemia temporária, o que aumenta o risco de

infecção, além de perpetuar o processo inflamatório nas úlceras não permitindo seu fechamento. (MUSTOE, 2004; BOWLER; DAVES, 1999).

O trabalho do fisioterapeuta é, inicialmente, prevenir o surgimento das ulcerações, principalmente em leitos hospitalares, fazendo mobilizações nas articulações do paciente ou mesmo fazendo a mudança de decúbitos num intervalo de duas horas, ou em domicílio, orientando os familiares a fazerem a mobilização das articulações, a mudança de decúbito e a proteção das proeminências ósseas, lugares mais comuns para o surgimento desse tipo de lesão dérmica. No entanto, com o quadro de ulceração em andamento, o fisioterapeuta usa de alguns recursos como a massagem com gelo ao redor da lesão, na tentativa do efeito vasoconstritor do gelo desviar a circulação superficial mais profundamente. Outro recurso bastante utilizado pelo fisioterapeuta na tentativa de acelerar o processo de cicatrização das úlceras cutâneas é o ultra som de baixa intensidade. Segundo Dyson, (1978) o ultra-som se mostrou eficiente no que diz respeito à remodelação tecidual. O ultra-som de 3MHz, se usado com intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, no modo pulsado, ou $8,0 \text{ W/cm}^2$ pulsado ou $0,1 \text{ W/cm}^2$, contínuo, promoveu total reepitelização tecidual com 21 dias de tratamento.

Num outro estudo, Mendonça et al (2006), utilizou o ultra-som de baixa intensidade, 30 mW/cm^2 , com frequência de 1,5MHz, no modo pulsado com largura de pulso de $200\mu\text{s}$, para avaliar os efeitos na taxa de cicatrização de feridas em ratos. Os animais foram divididos em dois grupos, onde num grupo os animais sofreram irradiação simulada e no outro grupo os animais sofreram irradiação efetiva. Os animais foram sacrificados nos tempos de 3, 7 e 14 dias, para posterior

análise histológica. Os resultados mostraram, com relação à taxa de cicatrização das feridas, que os animais sacrificados nos dias 3 e 7 não mostraram diferenças em relação ao grupo controle, porém, nos animais que foram sacrificados com 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa. As análises histológicas demonstraram que, no grupo com 3 dias pós-lesão, pode-se observar uma maior quantidade de fibrina, além de um maior número de monócitos e neutrófilos, quando comparado com o controle. Já no grupo com 7 dias pós-lesão, observou-se uma maior deposição de fibras de colágeno e vasos neo-formados, ou seja, maior quantidade de tecido de granulação, no grupo efetivamente tratado, quando comparado com o grupo não tratado. Já no grupo de 14 dias além das fibras de colágeno mais maduras e organizadas, observou-se uma quantidade maior de anexos da pele, como glândulas sebáceas e pelos no grupo tratado do que no grupo controle.

Um recurso muito usado nos dias atuais, no campo da fisioterapia, como modalidade não-invasiva, é a terapia a laser de baixa intensidade. Muitos estudos são feitos para se avaliar a real eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no que diz respeito ao tratamento de lesões de tecidos moles e os resultados têm sido bastante satisfatórios. Apesar de vários estudos realizados com terapia a laser de baixa intensidade, principalmente no espectro de luzes com comprimentos de onda visíveis e infravermelhas, pouco se sabe com relação aos mecanismos de interação com o tecido biológico e quais os efeitos fotoquímicos e fototérmicos que esse recurso pode exercer sobre esses tecidos (POSTEN *et al.*, 2005).

1.2 - TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Laser é um acrônimo e significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que se traduz como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. A luz pode ser descrita como emissão eletromagnética com algumas características que a identificam plenamente e são contidas numa grande faixa e contém suas peculiaridades. Essas emissões estão organizadas segundo o que se chama de “espectro de radiações eletromagnéticas”. Esse espectro é composto por radiações infravermelhas, visíveis, ultravioletas dentre outras e o que diferencia o tipo de radiação emitida são os comprimentos de onda (figura 1). Os lasers utilizados na área médica emitem radiações na faixa de luzes vermelhas, que são visíveis, infravermelhas e não são ionizantes. Para se identificar em que parte do espectro se encontra uma determinada radiação é necessário se saber o comprimento de onda dessa radiação (ALMEIDA-LOPES; LOPES 2005).

Espectro de oscilações eletromagnéticas.

Figura 1. Espectro de oscilação dos comprimentos de ondas das ondas eletromagnéticas: Fonte Almeida-Lopes & Lopes, 2005.

Os efeitos biológicos do laser sobre os tecidos são múltiplos e complexos, porém pouco compreendidos, particularmente quanto às reações estimulantes e inibitórias que podem ser provocadas por esta irradiação. Uma explicação para a interação do laser com o tecido biológico pode ser a capacidade individual de o tecido absorver a energia de acordo com o comprimento de onda, o que possivelmente afetaria a permeabilidade da membrana celular, causando alterações nessa estrutura. Células diferentes possuem receptores de luz diferentes e, conseqüentemente, comprimentos de ondas diferentes podem ter

efeito estimulante ou inibitório sobre células específicas (LOW; REED, 2001; HARRIS, 1991; ALMEIDA-LOPES; LOPES *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que a luz vermelha do Laser produz um aumento na síntese de Trifosfato de Adenosina (A.T.P) e Difosfato de Adenosina (A.D.P.), além de alterar o potencial de membrana, fazendo com que haja um aumento na taxa de proliferação celular (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001).

Vladimirov, *et al* (2004); Wedlock, *et al*, (1996) sugerem também, que uma das explicações para o aumento da produção mitótica das células é que, após irradiação laser, haja um aumento dos íons de cálcio no citoplasma celular de macrófagos e linfócitos, bem como um aumento da divisão celular, ativação da síntese de proteínas e citocinas e melhora da circulação sangüínea.

O laser tem sido muito estudado para o tratamento de vários tipos de lesões traumato-ortopédicas e dermatológicas. Segundo Tadakuma, (1993) o laser é efetivo para analgesia e modulação do processo inflamatório, além de reduzir a resposta inflamatória local, mostrando efeitos benéficos sobre a cura de lesões. A terapia a laser também se mostrou efetiva no tratamento de lesões tendíneas, nas quais se pode observar um aumento nos níveis de hidroxiprolina nos grupos tratados com laser ou na combinação de laser com ultra-som terapêutico, ao serem comparados com seus respectivos controles (DEMIR *et al.*, 2004).

1.3 - TERAPIA A LASER *IN VITRO*

Vinck *et al*, (2003) avaliaram a taxa de proliferação de fibroblastos *in vitro* com diferentes doses laser e diferentes comprimentos de onda. Nesse estudo foram utilizados laser com comprimento de onda de 570nm (luz verde), 660nm (luz vermelha), 830nm (luz infravermelha) e 950nm (luz infravermelha) com doses de 0,1; 0,5 e 1,0J/cm² respectivamente. As culturas de células foram irradiadas, em placas com 96 poços, por 3 dias seguidos, sendo que as culturas controles não sofreram irradiação laser. Após a irradiação os meios de cultura de cada poço eram renovados e as placas incubadas por 24 horas para que as células fossem quantificadas. Todos os grupos que sofreram a irradiação mostraram um aumento, estatisticamente significativo, na taxa de proliferação dos fibroblastos, quando comparados com seus respectivos controles, exceto o grupo que sofreu irradiação com comprimento de onda de 950nm na avaliação com 72 horas.

Webb & Dyson (2003) estudaram a terapia a laser de baixa intensidade em linhagem de fibroblastos. Essas células foram retiradas de pele humana normal e de cicatriz hipertrófica para que pudessem sofrer radiação laser *in vitro*. As doses utilizadas foram de 2,4 e 4,0J/cm², o comprimento de onda de 880nm e potência de 16mW. Pode-se observar nos resultados que houve uma diminuição no número de células, tanto da cicatriz hipertrófica quanto da pele normal, quando comparadas com o controle não irradiado, após irradiação laser com dose de 2,4J/cm². Para as células da cicatriz hipertrófica, a maior diminuição foi no 5º dia de contagem celular, enquanto que para as células de pele normal a diminuição na contagem ocorreu no 4º e 5º dias de contagem celular.

Num estudo realizado com fibroblastos de gengiva humana, *in vitro*, com diferentes concentrações de meio de cultura de soro fetal bovino, irradiados com laser de diferentes comprimentos de onda, 670nm, 692nm, 780 e 786nm, porém com a mesma dose, $2\text{J}/\text{cm}^2$, observou-se um aumento estatisticamente significativo, na taxa de proliferação celular dos fibroblastos irradiados com laser, com relação ao grupo controle, dependente da concentração do meio de cultura que essas células se encontravam. O mesmo aconteceu quando se comparou a taxa de crescimento celular com os diferentes comprimentos de onda laser, não se observando diferença estatisticamente significativa entre os diferentes comprimentos de onda da terapia a laser. (ALMEIDA-LOPES et al., 2001)

Num estudo recente Hawkins & Abrhamse (2006) avaliaram a taxa de proliferação e a viabilidade celular de fibroblastos humanos *in vitro* após irradiação laser com comprimento de onda de 632nm, potência de $3\text{ mW}/\text{cm}^2$ e dose de 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e $16,0\text{ J}/\text{cm}^2$ por 2 dias consecutivos, sendo que no intervalo entre as irradiações, as culturas celulares eram incubadas à 37°C . Os resultados desse estudo mostraram que a dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ induziu a proliferação e aumentou a viabilidade celular de fibroblastos quando comparado com o respectivo controle e com as doses maiores, de 10 e $16\text{ J}/\text{cm}^2$ onde se observou uma diminuição da viabilidade celular dos fibroblastos.

1.4 - TERAPIA A LASER *IN VIVO*

Alguns estudos têm mostrado que a terapia a laser de baixa intensidade é um recurso eficaz na cicatrização de tecido ósseo, principalmente em modelo animal.

Young, 1989 (*apud* Low & Reed, 2001) examinou diversas células envolvidas no processo cicatricial numa base fotobiológica do uso clínico desta modalidade, especialmente para a promoção de cicatrização e processo de reparo de feridas. Como resultado desse trabalho, foi verificado que comprimentos de onda de 660, 820, e 870nm estimulavam os macrófagos a liberarem fatores de proliferação de fibroblastos acima de níveis encontrados no grupo controle, acelerando o processo de cicatrização. Ao avaliarem a terapia a laser com doses de $4\text{J}/\text{cm}^2$, no tratamento de úlceras, esta dose se mostrou mais efetiva no crescimento de miofibroblastos, deposição de colágeno e fibras elásticas e redução de edema e infiltrado inflamatório (LOW; REED, 2001, PUGLIESE *et al.*, 2003, MEDRADO *et al.*, 2003).

Em outros estudos realizados *in vitro*, foi utilizado laser com comprimento de onda de 780nm, potência de 1 W e dose de $300\text{J}/\text{cm}^2$ foi feito um defeito ósseo em fêmures dissecados de ratos para avaliar os efeitos da terapia a laser no defeito ósseo nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Foi observado que houve um aumento de cálcio e de fosfatase alcalina, e também, um aumento do óxido nítrico (NO) após 21 dias de irradiação, quando comparado ao seu respectivo controle, concluindo que o laser pode ser efetivo no tratamento de defeitos ósseos (GUZZARDELA *et al.*, 2002, KARU *et al.*, 2005).

Quando irradiado laser com comprimento de onda de 655nm, com doses de 0,5, 1,0 e $2,5\text{J}/\text{cm}^2$, no músculo tibial anterior de ratos, fadigados por estimulação

elétrica, observou-se um aumento, estatisticamente significativo, na força de contração muscular dos animais que sofreram irradiação laser, enquanto que o grupo controle, que não sofreu irradiação laser, teve uma diminuição média, da força de contração muscular, na ordem de 50%. (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006).

Nissan *et al* (2006) realizaram um estudo onde foram feitas duas incisões, uma de cada lado, na parte inferior da mandíbula de ratos e foi realizado uma fratura óssea nessas mandíbulas com medidas de 1mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. Os autores utilizaram terapia a laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 904nm (AsGa) e densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e irradiância de $22,4\text{mW}/\text{cm}^2$. A fratura do lado esquerdo foi considerada a controle, ou seja, que não sofreu irradiação laser. Os animais foram sacrificados nos prazos de 1, 2 e 4 semanas para avaliação da formação de novo calo, radiocálcio, fosfatase alcalina, indicativos de atividade osteogênica. Os resultados desse estudo mostraram que o laser com $4\text{mW}/\text{cm}^2$, nos animais sacrificados com 2 semanas de pós-cirúrgico, teve um maior acúmulo de radiocálcio nas fraturas tratadas, quando comparadas com o lado contra-lateral, não tratado com terapia a laser, resultados esses não observados quando se utilizou laser com incidência de $22,4\text{mW}/\text{cm}^2$. Quando se comparou a atividade de fosfatase alcalina nas fraturas tratadas com terapia a laser e comparou-se com o controle, não se observou diferença estatisticamente significativa nos sacrificados nos diferentes períodos de tempo, quando comparados com os respectivos controles.

Schalger *et al* (2000) utilizaram terapia a laser de baixa intensidade para comparar os efeitos de dois diferentes comprimentos de onda, 635nm e 690nm,

com dose de $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ e potência de 30 mW, em estudo clínico em modelo de queimaduras em animal. Foi utilizado um instrumento de metal com 14mm de diâmetro, previamente aquecido em bico de Bunsen, por 10 segundos e em seguida pressionado sobre a pele do animal por um período de 4 segundos para a lesão. Observou-se que houve uma diminuição no tamanho, no edema e no eritema no local da ferida, sugerindo um efeito benéfico do laser sobre queimadura.

Durante o processo cicatricial, um importante evento é a fase de fibroplasia, onde pode-se observar a formação de novos vasos (angiogênese) e a deposição de matriz extracelular e colágeno. Alguns fatores de crescimento são importantes nessa fase da cicatrização são o VEGF e iNOS.

Tuby *et al* (2006) utilizaram terapia a laser com comprimento de onda de 804nm e dose de $0,96\text{J}/\text{cm}^2$ para avaliar a modulação de VEGF e iNOS, em ratos com infarto do miocárdio induzido. Após a aplicação laser, os animais foram sacrificados e os corações retirados num período de 2,5; 24; 48 e 72 horas após o infarto. Os resultados demonstraram que não houve diferença na produção de VEGF nos grupos que foram sacrificados com 24 e 48 horas pós infarto porém, houve um aumento significativo na produção de VEGF nos animais sacrificados com 2,5 horas pós-infarto, comparando-se com o controle não irradiado. Também foi verificado um aumento, altamente significativo, na produção de VEGF nos animais com 2 dias pós irradiação, observando-se uma diminuição nos animais com 3 dias pós irradiação laser. A produção de iNOS foi estatisticamente maior nos grupos tratados com laser que depois da irradiação sofreram o infarto. Nesse mesmo estudo os autores utilizaram 60 corações de ratos intactos e dividiram em 3 grupos

para que sofressem irradiação laser com doses de 0,6; 1,44 e 2,04J/cm² e logo após essa radiação laser os animais foram induzidos ao infarto do miocárdio. Os animais sofreram irradiação laser 7 dias antes do infarto e foram sacrificados 21 dias após a irradiação com laser. Os resultados, dessa fase dos experimentos, mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo na formação de novos vasos sangüíneos, observado na análise imunohistoquímica, nos grupos que sofreram irradiação laser com potência de 5 e 12 mW/cm², comparando-se com seus respectivos controles.

Reddy, (2003) avaliou a taxa de cicatrização de feridas cutâneas, com terapia a laser de baixa intensidade, em modelo animal com diabetes induzida por infusão de estreptozotocina. Após indução da diabetes, as feridas foram realizadas, no dorso dos animais, com *punch* de biópsia, medindo 6mm de diâmetro. A terapia a laser foi feita utilizando comprimento de onda de 904nm e dose de 1J/cm². Os resultados desse experimento foram comparados com um experimento prévio, (Reddy, *et al* 2001), porém utilizando laser He-Ne, com comprimento de onda de 632 e mesma dose, 1J/cm². Os resultados mostraram que quando as feridas são tratadas com laser He-Ne, ocorre um aumento na força de estresse e torção da área cicatrizada e um aumento na deposição de colágeno maior do que nas úlceras tratadas com laser AsGaAl, concluindo que células diferentes possuem receptores de luz diferentes.

Para avaliar a taxa de contratura e força tensiva de feridas realizadas no dorso de ratos, Allendorf, *et al* (2007) utilizaram terapia a laser (632,8nm). Nesses animais foram realizadas 2 lesões, uma de cada lado, com 1,5 cm de diâmetro, no

dorso desses animais, sendo que apenas uma ferida era tratada e a ferida contralateral era usada como controle. Nesse experimento os animais foram tratados com dose de 1, 2 e 4 J/cm². Os pesquisadores não encontraram diferenças estatisticamente significante nos resultados desse experimento.

1.5 - TERAPIA A LASER EM HUMANOS

Enwemeka et.al.⁽¹⁾ pesquisadores do *New York Institute of Technology*, aplicaram laser AsGaAl (830nm) para a cicatrização em úlceras diabéticas de humanos que não responderam aos tratamentos convencionais. O experimento tipo duplo cego (1 e 2) contendo dispositivo com chave em duas posições (laser e placebo). Os pacientes receberam tratamento laser ou placebo por um período de 10 semanas sendo cinco semanas de tratamento (placebo ou real) e nas outras cinco semanas inverteu o tratamento (real ou placebo), aplicados duas vezes por semana. Como resultado, ocorreu cicatrização completa das feridas em 4 dos 7 pacientes durante o tratamento com laser. As feridas de dois pacientes cicatrizaram dentro das cinco primeiras semanas sem necessidade do tratamento seguinte. Nenhum dos pacientes que receberam placebo, teve as feridas cicatrizadas. No entanto, pouco se sabe sobre sua ação sobre a microbiota de úlceras crônicas, assim como as diferentes doses inibitórias ou estimulatórias do crescimento bacteriano.

Em úlceras diabéticas tratadas com laser He-Ne durante cinco dias consecutivos na semana, foi observado cura total dessas feridas num prazo de três semanas, seguido de um aumento significativo nas forças de estresse, absorção de

(1) Dados não publicados Notícia dada por Chukuka Enwemeka, em conversa informal

energia, resistência e estresse de torção, além de um aumento na produção de colágeno em relação ao grupo controle. Em outro estudo realizado com úlceras diabéticas, foi observado uma significativa melhora da epitelização, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno na área da ferida, após irradiação laser (YU *et al.*, 1997).

O laser de baixa intensidade é amplamente usado no reparo de tecidos moles. No entanto, seu uso na cicatrização de úlceras deve ser precedido de uma boa avaliação, principalmente quanto ao fato da úlcera estar ou não infectada. Isto porque existem dúvidas quanto ao efeito, em culturas bacterianas, dessa modalidade terapêutica. Por outro lado é consenso quanto sua capacidade de induzir proliferação celular.

Tiphlova & Karu, (1991) ao irradiarem laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de 890nm, uma cultura de *Escherichia coli* observaram que a dose de $0,7\text{J}/\text{cm}^2$ estimulou o crescimento bacteriano, enquanto que doses maiores, $2,5\text{J}/\text{cm}^2$, diminuíram a taxa de proliferação bacteriana.

Respostas diferentes foram encontradas para tipos de bactérias diferentes. Segundo Nussbaum, *et al*, (2002) houve uma diminuição na quantidade de *Pseudomonas aeruginosa*, quando irradiada com laser de 810nm e doses de $1-20\text{J}/\text{cm}^2$, porém de *Escherichia coli*, com mesmas doses e mesmo comprimento de onda, observou-se um crescimento significativo na taxa de proliferação dessas bactérias enquanto que com cultura de *Staphylococcus aureus*, não foi observado diferenças significativas na taxa de proliferação quando comparado com seu respectivo controle.

Assim, torna-se relevante a investigação sobre a inter-relação bacteriana de diferentes espécies frente ao laser de baixa intensidade com diferentes comprimentos de onda (685nm e 830nm) e associação das mesmas nas diferentes doses de aplicação, além de avaliar a interferência da dose inibitória máxima encontrada no estudo *in vitro* no processo de cicatrização de úlceras cutâneas em modelo animal.

2. JUSTIFICATIVA

Com o aumento da população idosa há um aumento significativo das úlceras crônicas no cotidiano médico, fisioterapêutico e da enfermagem.

Geralmente, são úlceras de membro inferior, de pressão ou neuropáticas de duração longa, tratamentos variados que geram diminuição na qualidade de vida e altos custos tanto para a saúde pública quanto para o indivíduo.

Em vários trabalhos observamos que a colonização bacteriana, diversificada, das úlceras de pressão, funciona como mais um fator que dificulta a cicatrização.

Diante das fases evolutivas da cicatrização descritas, torna-se importante a investigação sobre as várias formas de tratamento de úlceras cutâneas buscando acelerar sua cicatrização.

Na literatura, inúmeros trabalhos relatam sobre a utilização clínica do laser de baixa intensidade estimulantes da cicatrização, entretanto, não é observado uma padronização quanto ao tipo de luz emitida, dose e comprimento de onda aplicados, gerando resultados muito heterogêneos e, conseqüentemente, dúvidas quanto à sua influência sobre a microbiota, inibindo-a ou estimulando-a, além da sua eficácia na utilização *in vivo*.

Assim, a realização do trabalho se justifica para avaliar e comparar a eficácia do laser 685nm e 830nm aplicados separados e associadamente, sobre diferentes espécies bacterianas *in vitro*. Além disso, busca-se avaliar a cicatrização no modelo experimental de úlceras abertas em coelhos tratadas com diferentes parâmetros da terapia a laser de baixa intensidade, além de analisar a influência da luz aplicada sobre as bactérias inoculadas *in vivo*. Desse modo, busca-se consolidar o entendimento e conhecimento dos mecanismos em modelo animal

para posteriores aplicações clínicas em úlceras crônicas e conseqüente melhoria na qualidade de vida para os pacientes com tal enfermidade.

3. OBJETIVOS

- Avaliar, *in vitro*, a influência na taxa de crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sob diferentes doses e densidades de energia de irradiação laser de baixa intensidade (685 e 830nm) aplicados separadamente, comparando com o grupo controle não irradiado.
- Avaliar, *in vitro*, a influência na taxa de crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sob diferentes doses e diferentes densidades de energia de irradiação laser de baixa intensidade (685 e 830nm) aplicados seqüencialmente, comparando com controle não irradiado.
- Avaliar, após padronização da dose inibitória do laser (685 e 830nm) a interferência desta na evolução do processo cicatricial das úlceras cutâneas agudas na orelha de coelhos não infectadas (grupo de cicatrização laser induzida) comparando com um grupo de úlceras infectadas (exposição ao laser com as feridas previamente contaminadas com bactérias Gram positivas e Gram negativas).
- Avaliar, após padronização da dose inibitória do laser (685 e 830nm) a interferência desta, aplicada sequencialmente, na evolução do processo cicatricial das úlceras cutâneas agudas na orelha de coelhos não infectadas (grupo de cicatrização laser induzida) comparando com um grupo de úlceras infectadas (exposição ao laser com as feridas previamente contaminadas com bactérias Gram positivas e Gram negativas).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4- Material e Métodos

4.1 – Estudo Bacteriológico

4.1.1- Obtenção e Armazenagem das Bactérias

Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) fornecidas pelo Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

4.1.2 –Cultura, Diluição e Plaqueamento.

Partiu-se de um inóculo bacteriano em meio de cultura sólido Infusão Cérebro Coração (BHI) ágar. Após 72 horas esse inóculo foi transferido para novo meio de cultura (BHI)a e mantido em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período de incubação de 24 horas o inóculo foi transferido para meio de cultura caldo BHI e incubado por 20 horas a 37°C para que depois essa suspensão bacteriana fosse centrifugada, três vezes a 4500 rpm por 15 minutos e lavada com solução fisiológica estéril. Após a centrifugação as bactérias foram suspensas em 10ml de solução fisiológica. A seguir foram transferidos 10ul das diferentes suspensões bacterianas, para cada poço da placa de microtitulação, onde continham 90ul de solução fisiológica estéril. Desse modo o volume final era de 100ul por poço e a concentração final da suspensão padronizada era de 10^2 células bacterianas.

Para o estudo com o laser de 685 e 830nm, buscou-se a padronização das doses, distribuindo cada dose diferente em dose poços na placa de microtitulação, o mesmo acontecendo com a amostra controle, conforme esquema:

C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J	1.0J
2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J	2.0J
4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J	4.0J

C=controle sem irradiação.

Figura 2: Desenho esquemático do experimento para padronização do laser *in vitro* nas diferentes doses.

Nas doses descritas acima (1.0, 2.0 e 4.0 J) as densidades de energia foram de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente.

Todas as cinco placas tiveram suas identificações estabelecidas de acordo com a dose a ser irradiada, sendo que os 10 poços controles, ou seja, que não sofreram irradiação, foram identificadas como controle (C).

4.1.3 – Protocolo de Estimulação a Laser e Semeadura

Laser 685 e 830nm: Cada poço foi irradiado uma única vez com laser de baixa intensidade, emitido em 685 e 830nm na dose correspondente à linha previamente identificada. A linha C não recebeu irradiação sendo considerada a amostra controle.

Após irradiação laser, as placas de microtitulação foram incubadas por um período de 1 hora, à temperatura de 37°C. Posteriormente, 10ul foram pipetados de cada poço e semeados, com auxílio da alça de Drigalsky, em placa de Petri, que

continha meio de cultura Infusão de Cérebro e Coração agar (BHI) para bactéria *S. aureus* e meio de cultura McConkey agar para bactéria *P. aeruginosa*. A seguir as placas eram incubadas à temperatura de 37°C, em estufa, por um período de 24 horas.

Figura 3: Esquema da Irradiação laser em Placa de Microtitulação

4.1.4 – Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Concluído o período de incubação, um único indivíduo quantificou as UFCs e posteriormente utilizou a medida aritmética das mesmas.

Figura 4: Esquema da quantificação das UFCs em Placa de Petri

Estudo *in vitro*

P. aeruginosa ATCC: 15442

S. Aureus ATCC: 6538

Figura 5: Esquema ilustrativo do experimento *in vitro*

4.1.5 – Equipamento

Laser 685 e 830nm: Foi utilizado equipamento laser Flash lase de semicondutor sólido da marca DMC Equipamento, São Carlos, com comprimentos de onda de 685 e 830nm e potência de 100mW. A ponteira foi fixada ao próprio aparelho, que contém um suporte próprio para a finalidade de deixa-lá fixa, perpendicularmente à base, distante 1cm da placa. A determinação da distância da ponteira à base foi determinada a fim de se obter uma área de irradiação circular de 1cm² de diâmetro.

Nesse estudo também foi utilizado a associação dos dois comprimentos de onda (685 e 830nm) para avaliar a taxa de crescimento bacteriano *in vitro* e a

cicatrização de feridas, previamente contaminadas com bactérias Gram positiva e Gram negativa, em modelo animal.

Figura 6: Foto ilustrativa do equipamento laser Flash Laser III

4.2 – Estudo da Cicatrização em Modelo Animal.

4.2.1 – Seleção dos animais

Respeitando as normas éticas que regem a pesquisa com animais estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação FMRP-USP (protocolo nº. 098/2007) foi selecionado 01 coelho por grupo, para cada tempo de análise, machos, pesando entre 1,0Kg e 1,5Kg, para acondicionamento prévio de 15 dias ao procedimento cirúrgico. Os coelhos foram adquiridos junto ao Biotério Central da FMRP-USP e mantidos no biotério do departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

4.2.2- Ato Anestésico

CIRÚRGICO: Os coelhos foram anestesiados com Ketamina 10% 1,5ml e xylazina 3% 1,0ml por animal.

Terapia Laser: Para aplicação do laser, com duração aproximada de 1 minuto e 30 segundos, os coelhos foram mantidos em câmara fechada contendo solução de éter para obtenção de anestesia rápida dos animais.

4.2.3- Ato cirúrgico

Após anestesia, os animais tiveram suas orelhas depiladas, onde foram feitas 6 feridas circulares, em ambas as orelhas, com 6mm de diâmetro cada ferida, conforme esquema abaixo:

Figura 7: Esquema ilustrativo do modelo de feridas. Adaptado de (Mustoe TA, 1990)

Após a cirurgia todos os coelhos receberam dipirona sódica via oral, numa dose de 240mg/Kg, para efeito analgésico dos animais.

4.2.4 – Padronização dos grupos e tempos de avaliação.

Os animais tiveram suas úlceras lavadas com soro fisiológico e cobertas com curativo de gaze presas com esparadrapo para que houvesse proteção das feridas e em seguida receberam solução analgésica, no pós-operatório imediato, sendo mantidos em condições de isolamento em gaiolas individualizadas, com água e comida *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas no biotério da Clínica Médica da FMRP-USP.

Foram constituídos seis grupos, cada grupo contendo 1 coelho com 6 feridas em cada orelha (n=12), e feitas captura de imagem com máquina fotográfica digital, nos períodos de 24 horas, 03 dias, 07 dias, 10 dias e 16 dias para posterior avaliação da área da ferida com o programa ImageJ[®]. Os grupos se diferenciaram conforme tratamento das úlceras, a saber:

- **Grupo 1:** CICATRIZAÇÃO LASER 685nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato com uma suspensão bacteriana padronizada de *S. aureus* correspondente a escala 1 de MacFarland (3.10^8 células/mL), e acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados completando um ciclo de 16 dias.

- **Grupo 2:** CICATRIZAÇÃO LASER 830nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato com uma suspensão bacteriana padronizada de *S. aureus* correspondente a escala 1 de MacFarland (3.10^8 células/mL), acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados.

- **Grupo 3:** CICATRIZAÇÃO LASER 685nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato com uma suspensão bacteriana padronizada de *P. aeruginosa* correspondente a escala 1 de MacFarland (3.10^8 células/mL), acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados.

- **Grupo 4:** CICATRIZAÇÃO LASER 830nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato uma suspensão bacteriana padronizada de *P. aeruginosa* correspondente a escala 1 de MacFarland (3.10^8 células/mL), e acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados.

- **Grupo 5:** CICATRIZAÇÃO LASER 685 nm INDUZIDA: O coelho teve suas úlceras acompanhadas durante 16 dias com irradiação laser com comprimento de onda de 685nm na dose com maior atividade inibitória do crescimento bacteriano a ser encontrada e padronizada na primeira fase do projeto (estudo bacteriológico) em dias alternados, completando um ciclo de 16 dias.

- **Grupo 6:** CICATRIZAÇÃO LASER 830 nm INDUZIDA: O coelho teve suas úlceras acompanhadas durante 16 dias com irradiação laser com comprimento de onda de 830nm na dose com maior atividade inibitória do crescimento bacteriano a ser encontrada e padronizada na primeira fase do projeto (estudo bacteriológico) em dias alternados, completando um ciclo de 16 dias.

- **Grupo 7:** CICATRIZAÇÃO LASER 685 + 830nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVA: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato com bactérias Gram-, na escala 1 de McFarland, e acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados. A aplicação laser foi feita com os diferentes comprimentos de onda estudados sequencialmente, sendo o comprimento de onda de 685nm aplicado primeiro.

- **Grupo 8:** CICATRIZAÇÃO LASER 685 + 830nm INDUZIDA DAS ÚLCERAS CONTAMINADAS COM BACTÉRIAS GRAM POSOTIVA: O coelho teve suas úlceras contaminadas no pós-operatório imediato com bactérias Gram+, na escala 1 de McFarland, e acompanhadas durante 16 dias com interferência da terapia laser, em dias alternados. A aplicação laser foi feita com os diferentes comprimentos de onda estudados sequencialmente, sendo o comprimento de onda 685nm alicado primeiro.

- **Grupo 9:** CICATRIZAÇÃO NATURAL: O coelho teve suas úlceras acompanhadas durante 16 dias sem interferência de nenhuma terapia que acelere a cicatrização.

Figura 8: Esquema ilustrativo do experimento *in vivo*

4.2.5 – Análise clínico - fotográfica

Para análise clínica, os animais tiveram suas úlceras avaliadas por fotografia digital, utilizando-se da máquina da marca Sony, modelo pc93, e com auxílio de uma régua milimetrada para aquisição da imagem e posterior análise de medidas da área das feridas, nos tempos 24 horas, 03 dias, 07 dias, 10 dias e 16 dias com o programa Image J®.

5 – Análise dos resultados

Na fase primeira do projeto, os resultados foram baseados na contagem das Unidades Formadoras de Colônias e as diferenças entre as diferentes doses de laser e controle foram analisados pelo programa GraphPadPrisma, teste ANOVA

para amostras não paramétricas (teste de Bonferroni). O mesmo serviu para a segunda fase, que foram analisados tempos de cicatrização total das lesões entre os grupos amostrais. Para as comparações entre os resultados obtidos quando aplicadas doses iguais sobre mesmo tipo de bactérias, variando apenas o comprimento de onda, foi utilizado o teste t para amostras não paramétricas.

Análise de Imagem (*Image J*®)

Figura 9: Esquema ilustrativo da análise de imagem utilizando software Image J

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* mostraram que o laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 685 nm inibiu o desenvolvimento de *S. aureus*, em todas as doses utilizadas (1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente) quando comparada com o controle não irradiado com laser, sendo essa diferença nas diferentes doses, estatisticamente significativa ($P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$ respectivamente).

Outro resultado, estatisticamente significativo, observado nesse experimento, foi que a dose de 4J também se mostrou mais inibitória na taxa de crescimento bacteriano de *S. aureus* quando comparada com a dose de 1J ($P < 0,01$).

Figura 10: Efeito do laser de baixa intensidade de 685nm nas doses 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente, sobre a taxa de crescimento bacteriano em cultura de *S.aureus* (UFCs).

Considerando o crescimento bacteriano do grupo controle como referencial, foram calculadas as taxas de inibição do crescimento para *S. aureus* quando submetidos às doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², no comprimento de onda de 685nm, as quais foram de 20, 34 e 47% respectivamente.

Quando o laser de baixa intensidade com o comprimento de onda 830nm nas doses de 1, 2 e 4 J, e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², testados *in vitro*, sobre *S. aureus*, os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa na taxa de crescimento das bactérias que sofreram irradiação com laser 2J e fluência de 66,66 J/cm² ($P<0,05$) e 4J fluência de 133,33 J/cm² ($P<0,01$), quando comparadas com o respectivo controle, ou seja, não irradiadas. Porém, quando se comparou à dose 1J e fluência de 33,33J/cm² com o controle não irradiado não se observou diferença estatisticamente significativa na taxa de proliferação bacteriana (Figura 8).

As taxas de inibição do crescimento para *S. aureus* quando submetidos às doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², no comprimento de onda de 830nm foram de 21, 25 e 32% respectivamente.

O laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 685nm também foi utilizado para avaliar a taxa de crescimento bacteriano da espécie Gram negativa (*P. aeruginosa*) e pode-se observar que em todas as doses irradiadas (1, 2 e 4 J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente), houve uma inibição na taxa de proliferação bacteriana, estatisticamente significativa ($P<0,001$), quando comparadas com o controle não irradiado por laser (Figura 12).

Figura 11: Efeito do laser de baixa intensidade de 830nm nas doses 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente, sobre a taxa de crescimento bacteriano em cultura de *S.aureus* (UFCs).

Figura 12: Efeito do laser de baixa intensidade de 685nm nas doses 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente, sobre a taxa de crescimento bacteriano em cultura de *P. aeruginosa* (UFCs).

As taxas de inibição do crescimento para *P.aeruginosa* quando submetidas às doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², no comprimento de onda de 685nm foram de 49, 55 e 51% respectivamente.

O mesmo resultado inibitório pode ser observado quando o experimento foi realizado na mesma espécie bacteriana com laser com comprimento de onda de 830nm, sendo que as doses de 1, 2 e 4 J com fluência 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², foram inibitórias para o crescimento bacteriano quando comparado com o controle sem irradiação laser ($P<0,001$) como demonstrado na figura 13.

Figura 13: Efeito do laser de baixa intensidade de 685nm nas doses 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente, sobre a taxa de crescimento bacteriano em cultura de *P. aeruginosa* (UFCs).

Nesse comprimento de onda, as taxas de inibição do crescimento para *P.aeruginosa* quando submetidas às doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², foram de 39, 38 e 38% respectivamente.

Na proposta de avaliar a influência da terapia a laser de baixa intensidade com as diferentes doses 1, 2 e 4J com fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², porém com os dois comprimentos de onda (685 e 830nm) aplicados sucessivamente sobre ambas as culturas bacterianas, observando a influência da associação dos mesmos.

Observou-se que ao se aplicar o laser com os comprimentos de onda 685/830nm sucessivamente sobre culturas de *S. aureus*, houve uma inibição do seu crescimento quando submetidas a doses de 1, 2 e 4J com fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², e comparadas com o controle, sem irradiação (Figura 14).

Figura 14: Laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 685 e 830nm aplicados sucessivamente nas doses 1, 2 e 4J, e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente sobre a taxa de crescimento bacteriano em culturas de *S. aureus* (UFCs).

Com a associação dos diferentes comprimentos de onda sobre as culturas de *S.aureus*, as taxas de inibição obtidas nas doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², foram de 12, 29 e 36% respectivamente.

O mesmo resultado pode ser observado quando o laser com diferentes comprimentos de onda foi aplicado de forma associada sobre culturas de *P. aeruginosa*, mostrando uma inibição do crescimento, com todas as doses e densidades de energia utilizadas (figura 15).

Figura 15: Laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 685 e 830nm aplicados sucessivamente nas doses 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², respectivamente sobre a taxa de crescimento bacteriano em culturas de *P. aeruginosa* (UFCs).

Sobre as culturas de *P. aeruginosa*, os resultados foram semelhantes aos obtidos sobre *S. aureus*, pois a associação dos diferentes comprimentos de onda

proporcionou taxas de inibição nas doses de 1, 2 e 4J e fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm², foi de 12, 30 e 36% respectivamente.

Com o objetivo de comparar os efeitos dos diferentes comprimentos de onda entre si (685nm e 830nm), e estes à aplicação sucessiva dos mesmos (685/830nm), foram utilizadas as doses e fluências de maior efeito inibitório sobre as culturas das diferentes espécies.

Em relação à bactéria *S. aureus* sobre ambos os comprimentos de onda utilizados isoladamente, foi verificado que a dose estatisticamente mais inibitória para o seu crescimento foi 4J e a fluência foi de 133,33J/cm², sendo esta utilizada para análise comparativa à associação, conforme figura 16.

Figura 16: Influência dos comprimentos de onda aplicados isolada (685nm e 830nm) e sucessivamente (685/830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) de *S. aureus* na dose de 4J e fluência de 133,33J/cm².

Quanto às culturas de *P. aeruginosa*, foi observado que as doses de 2 e 4 J e fluência de 66,66 e 133,33J/cm², apresentaram maiores taxas de inibição bacteriana, tanto sobre os comprimentos de ondas aplicados isoladamente quanto associadamente, sendo estas utilizadas para análise comparativa, conforme figuras 17 e 18 respectivamente.

Figura 17: Influência dos comprimentos de onda aplicados isolada (685nm e 830nm) e sucessivamente (685/830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) de *S. aureus* na dose de 2J/cm² e fluência de 66,66J/cm².

Figura 18: Influência dos comprimentos de onda aplicados isolada (685nm e 830nm) e sucessivamente (685/830nm) sobre a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) de *S. aureus* na dose de 4J e fluência de 133,33J/cm².

<i>S. aureus</i>	1J (%)	2J (%)	4J (%)
685nm	20	34	47
830nm	21	25	32
685+830nm	12	29	36
<i>P. aeruginosa</i>	1J(%)	2J(%)	4J (%)
685nm	49	55	51
830nm	39	38	38
685+830nm	12	30	36

Figura 19: Percentual de UFCs bacteriana quando expostas a fototerapia a laser (685nm e 830nm isolados ou aplicados sucessivamente) nas doses de 1, 2 e 4J

Tabela com resultados do experimento *in vitro* em porcentagem

5.2 RESULTADOS *IN VIVO*

Nessa fase do experimento foi utilizada a terapia a laser de baixa intensidade para se avaliar o efeito cicatrizante em úlceras cutâneas realizadas na região dorsal das orelhas de coelho, comparando feridas previamente contaminadas com as diferentes espécies bacterianas utilizadas no estudo *in vitro*, com feridas que não foram previamente contaminadas.

A dose e a fluência utilizadas nos experimentos com modelo animal de cicatrização foi a mais inibitória do crescimento bacteriano verificada nos estudos *in vitro*, ($4\text{J}/\text{cm}^2$ e fluência de $133,33\text{J}/\text{cm}^2$) em ambos os comprimentos de onda 685nm e 830nm e com ambas as espécies bacterianas.

Após 24 horas do procedimento cirúrgico as áreas das feridas avaliadas continuaram com o mesmo diâmetro do início do experimento (6 mm), em todos os grupos, não apresentando sinais de cicatrização após uma única aplicação da terapia a laser.

No terceiro dia de seguimento, as áreas das úlceras foram analisadas de forma clínico-fotográfica, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com laser, entretanto diferenças foram observadas quando estes foram comparados à cicatrização natural, exceto as úlceras contaminadas por *S. aureus* (G1 e G2), conforme demonstrado na figura 19.

Figura 20: Análise das áreas das úlceras (cm²) no 3º dia de seguimento tratadas com laser nos diferentes comprimentos de ondas na dose de 4J e fluência de 133,33J/cm². .

Seguindo os mesmos parâmetros de dose, densidade de energia e comprimento de onda, a análise clínico-fotográfica das feridas feitas no 7º dia de pós-cirúrgico, mostrou diferença estatisticamente significativa entre as áreas ulceradas do grupo 1 (laser 685nm + bactérias G+) em relação às do grupo 4 (Laser 830nm + Bactérias G-) e também ao grupo 9 (cicatrização natural). No que diz respeito à cicatrização das feridas que não foram inoculadas bactérias (grupos 5 e 6), as mesmas não apresentaram diferenças em sua evolução, mesmo quando comparadas com os outros grupos, conforme figura 20.

Figura 21: Análise das áreas das úlceras (cm^2) no 7º dia de seguimento tratadas com laser nos diferentes comprimentos de ondas na dose de 4J e fluência de $133,33\text{J}/\text{cm}^2$.

No décimo dia de seguimento, houve redução das áreas das úlceras, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, como ilustrado na figura 21.

No 13º dias de seguimento, houve redução das áreas das feridas, entretanto, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento com associação de dois diferentes comprimentos de onda com os outros grupos experimentais. Quando se compara o grupo 7 com os outros grupos houve diferença estatisticamente significativa, como: Grupo 1 ($P < 0,01$), Grupo 2 ($P < 0,01$), Grupo 3 ($P < 0,05$), Grupo 4 ($P < 0,05$), Grupo 6 ($P < 0,01$) e Grupo 9 ($p < 0,01$). Quando a análise estatística é feita entre o grupo 8 e os demais grupos também se observou diferença estatística como: Grupo 1 ($P < 0,001$), Grupo 2 ($p < 0,001$), Grupo 3 ($p < 0,01$), Grupo 4 ($P < 0,05$), Grupo 5 ($p < 0,001$), Grupo 6 ($p < 0,001$) e Grupo 9 ($p < 0,001$), como demonstrado na figura 22.

Figura 22: Análise da área das úlceras/cm² no período de 10 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J e fluência de 133,33J/cm².

Figura 23: Análise da área das úlceras/cm² no período de 13 dias pós-cirúrgico, com aplicação de terapia a laser de baixa intensidade, com dose de 4J e fluência de 133,33J/cm².

No 16º dia de pós-cirúrgico, todas as lesões em todos os animais já se encontravam inteiramente cicatrizadas.

6. DISCUSSÃO

Discussão

A terapia a laser de baixa intensidade tem sido um dos recursos mais utilizados na tentativa de acelerar o processo cicatricial de úlceras cutâneas.

Os resultados *in vitro* mostraram que o laser de baixa intensidade parece ter um efeito dose e densidade de energia dependentes na taxa de inibição do crescimento bacteriano, observando maior inibição quando a dose e densidade de energia foi mais alta (4J e fluência de 133,33 J/cm²) em comparação com as doses mais baixas utilizadas (1 e 2J e fluências de 33,33 e 66,66 J/cm²). Ao se comparar os comprimentos de onda 685nm e 830nm para cada dose e espécie bacteriana, observou-se que para a bactéria Gram-positiva (*S.aureus*), o comprimento de onda de 685nm foi inibitório quando utilizado na dose de 4J com fluência de 133,33 J/cm², enquanto para a bactéria Gram-negativa (*P.aeruginosa*), irradiada com os mesmo comprimentos de onda (685 e 830nm), as doses de laser mais inibitórias foram de 2 e 4J/cm² com fluência de 66,66 e 133,33 J/cm² respectivamente. Na literatura, respostas diferentes foram encontradas em estudos, *in vitro*, com diferentes culturas bacterianas.

Utilizando laser de baixa intensidade, (Nussbaum et al, 2002) observaram uma diminuição na quantidade de *P. aeruginosa*, quando irradiadas com laser de 810nm e doses de 1-20J, porém quando a cultura de bactéria irradiada foi *Escherichia coli*, com as mesmas doses e o mesmo comprimento de onda, observou-se um crescimento significativo na taxa de proliferação dessas bactérias, enquanto com a cultura de *S. aureus*, não foram observadas diferenças significativas na taxa de

proliferação quando comparadas ao seu respectivo controle. Embora o comprimento de onda utilizado por Nussbaum e *et al* (2002) tenha sido de 810nm nas doses de 1 a 20J, seus resultados diferem dos encontrados nesse experimento, utilizando laser de 830nm e doses de 1 a 4J, pois houve significativa diferença estatística inibitória para o crescimento de *S. aureus* nas doses de 2 e 4J comparadas ao controle não irradiado. Essas diferenças se mantiveram significantes inclusive na dose de 1J, quando o laser utilizado foi o de comprimento de onda de 685nm, o que consolidam as diferenças encontradas em relação ao trabalho de (NUSSBAUM et al, 2000)

Em relação às culturas de *P. aeruginosa* os resultados encontrados evidenciaram inibição de aproximadamente 40% no seu crescimento quando submetidas ao laser de 830nm independente da dose aplicada, concordante com achados de Nussbaum e cols. Entretanto, quando as mesmas foram submetidas ao laser de 685nm, a taxa de inibição foi maior (51%) nas diferentes doses aplicadas, comprimento de onda este não utilizado por Nussbaum e cols.

Essas diferenças nas taxas de inibição entre as bactérias Gram-positivas e negativas, utilizando-se dos mesmos parâmetros laser, podem ser explicadas pelas bactérias possuírem moléculas foto-receptoras diferentes.

Karu et al, (1999) identificaram possíveis moléculas foto-receptoras na membrana celular de bactérias *E. coli*, porém, não mencionadas para bactérias *P. aeruginosa*. Com relação à bactéria *S. aureus*, por ser uma bactéria Gram positiva, possui uma membrana celular espessa, formada por camadas de peptidoglicanos e fosfolipídio, que fazem a proteção dessa espécie bacteriana, contra agentes

cáusticos, dissecantes e luzes, sendo assim o laser não produziu efeito inibitório/excitatório no crescimento dessa célula. Diferente desses achados, foi observado que ambos os comprimentos de onda utilizados (685 e 830nm) no presente estudo proporcionaram um efeito inibitório sobre as culturas de *S. aureus* discretamente menor que sobre as culturas de *P. aeruginosas*.

Devido aos resultados do experimento *in vitro* a dose utilizada no experimento em modelo animal foi a mais inibitória encontrada, ou seja, 4J com fluência de $133,33\text{J}/\text{cm}^2$. No experimento *in vivo* observou-se que, a terapia a laser acelerou o processo de cicatrização no 3º dia de avaliação, exceto quando aplicado em bactérias gram positivas, em relação à cicatrização natural, enquanto no 13º dia os lasers, exceto quando aplicados sucessivamente, apresentaram resultados semelhantes à cicatrização natural, independente do comprimento de onda e da ferida estar previamente contaminada com diferentes espécies bacterianas. Esses resultados reforçam os resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, de que a terapia a laser de baixa intensidade tem efeito inibitório na taxa de crescimento bacteriano, influenciando na fase inflamatória da cicatrização, podendo ser essa, uma das explicações dessa terapêutica acelerar o processo de cicatrização desse tipo de lesão.

Os resultados observados *in vivo* mostraram que, no 7º dia pós-cirúrgico, apenas o grupo 4 (laser 830nm/*P.aeruginosa*), apresentou diminuição na área das feridas, estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo 1 (laser 685nm/bactérias gram positivas), o qual apresentou menor cicatrização em relação à cicatrização natural.

Quando o tempo de aplicação laser foi de 10 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que diz respeito à área das feridas, que não foram previamente contaminadas, quando comparadas com as feridas em que as bactérias foram inoculadas no início do experimento e também ao grupo de cicatrização natural.

No 13º dia os grupos 7 e 8, onde a aplicação laser foi feita de forma associada (685 + 830nm) observou-se uma diferença estatística na área das feridas, quando comparado com os outros grupos, inclusive de cicatrização normal, indicando um retardo no processo de cicatrização das feridas.

Quando a análise fotográfica das feridas foi feita no 16º dia pós-cirúrgico, observou-se que todas as feridas de todos os grupos cicatrizaram totalmente.

Uma das explicações para o laser acelerar a taxa de cicatrização de feridas, pode ser o efeito dessa irradiação sobre os fibroblastos estimulando a deposição das fibras de colágeno, resultado esse observado no estudo realizado por Yasukawa, *et al*, (2007), além de observar um aumento na força tênsil do tecido que sofreu irradiação laser de baixa intensidade.

Uma grande deposição de colágeno também foi observada quando se comparou a influência da terapia a laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas em ratos diabéticos e não-diabéticos. Nesse experimento a dose laser usada foi 4J e comprimento de onda de 632,8nm. Os animais foram sacrificados com 3, 7 e 14 dias, para posterior análise histológica. A deposição de colágeno, observada nesse experimento, foi maior nos animais não diabéticos quando comparado com os animais diabéticos tratados com laser, porém, quando se

comparou os animais não tratados com laser com os animais tratados com laser a deposição de colágeno foi maior em ambos os grupos de animais, diabéticos ou não, tratados com laser terapia de baixa intensidade. (CARVALHO *et al.*, 2006).

Outro fator importante para a cicatrização de feridas é a formação do tecido de granulação, ou seja, formação de novos vasos sanguíneos e a deposição de colágeno no local da ferida. Rocha-Junior *et al* (2006) investigaram o comportamento de feridas cutâneas em ratos submetidos ao tratamento laser de baixa intensidade com dose 3,8 J e comprimento de onda de 870nm. Após 10 dias pós-cirúrgico as lesões apresentaram completa cicatrização, além de um aumento no número de fibroblastos e diminuição no infiltrado inflamatório no leito da ferida, sugerindo que a terapia a laser de baixa intensidade é um método eficaz no processo de reparação tecidual mais rápida e mais organizada.

Apesar de vários trabalhos na literatura buscando explicações sobre a influência do laser na cicatrização, principalmente na fibroplasia, granulogênese, poucos são os trabalhos que discutem a sua influência na fase inflamatória da cicatrização. Considerando as diferenças entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, os resultados obtidos demonstraram que os lasers influenciaram diretamente no início do processo de cicatrização, principalmente na fase inflamatória, diminuindo colonização bacteriana, e início da fase de formação tecidual, fatos estes que podem estar relacionados intrinsecamente à aceleração da cicatrização observada nas fases subseqüentes.

Durante os experimentos *in vitro*, verificou-se que a utilização de lasers diferentes aplicados sucessivamente (685 + 830nm) com a dose mais inibitória do

crescimento bacteriano encontrada *in vitro* (4J), apresentou inibição do crescimento bacteriano em relação aos mesmos aplicados isoladamente. Nos resultados dos experimentos *in vivo* com terapia a laser de baixa intensidade com comprimentos de onda diferentes aplicados sucessivamente, foram observadas diferenças das áreas ulceradas no 3º dia de avaliação, independente da contaminação, em relação à cicatrização normal, entretanto tais diferenças não se mantiveram durante o resto do seguimento, apresentando um efeito inibitório da associação sobre a cicatrização das úlceras. Tais achados no terceiro dia de seguimento corroboram sobre a influência do laser na fase inflamatória da cicatrização, interferindo na colonização bacteriana liberando fatores quimiotáticos importantes para influxo de células, como neutrófilos e macrófagos, importantes liberadores de citocinas e fatores de crescimento para células endoteliais e fibroblastos, essenciais para as fases de formação e de remodelação tecidual da cicatrização.

7. CONCLUSÃO

Conclusão

O uso da terapia a laser terapia de baixa intensidade mostrou ter um efeito inibitório na taxa de crescimento de bactérias tipo *S. aureus* e *P. aeruginosa*, *in vitro* e independe do comprimento de onda quando utilizada com dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e fluência de $133,33\text{J}/\text{cm}^2$. Quando o laser foi usado de forma associada observou-se que também há uma inibição no crescimento bacteriano em ambas as espécies, entretanto, ao ser comparado com os resultados dos experimentos onde se aplicou laser isoladamente, essa associação dos comprimentos de onda se mostrou menos efetiva sobre a taxa de inibição do crescimento bacteriano, podendo assim, prejudicar o processo de cicatrização de feridas.

Nos experimentos *in vivo*, os resultados observados reforçam os resultados do experimento *in vitro*, mostrando que a terapia a laser de baixa intensidade, quando aplicada isoladamente, ou seja, com apenas um único comprimento de onda, teve efeito inibitório no crescimento bacteriano, podendo assim influenciar a fase inflamatória da cicatrização, fazendo com que a ferida, mesmo contaminada, cicatrize em tempo parecido com feridas que não tenham prévia contaminação, fato esse não observado quando o laser foi usado de forma associada, que mostrou retardar, apenas nos 3º e 7º dia de avaliação, o processo de cicatrização.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENDORF, J. D. F.; BESSLER, M.; HUANG, J.; KAYTON, M. L.; LAIRD, D.; NOWYGROND, R.; TREAT, M. R. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as Assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Laser In Surgery and Medicine**, n. 20, p. 340-345, 2007.

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; HANDRIS, P.; KLETSAS, D.; LOUKAS, S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochemical and Photobiology Sciences**, p. 547-55, 2002.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluences. **Laser in surgery and Medicine**, n. 29, p. 179-184, 2001.

ALMEIDA LOPES, L; LOPES A. Técnicas de Drenagem Linfática Ativada por Laserterapia. **Estomatologia. Capítulo ?**, 2005.

ARNOLD, F.; WEST, D. Angiogenesis in Wound Healing. **Pharmacology Therapy**, n. 52, p. 407-422, 1991

BANGNATO, V. S. Os Fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, v.2, n. 2, p. 4-9, 2001.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation. The central role of TGF β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**. n. 5, p.1-11, 2003.

BIANCHI, V.; MAZZA, L. Rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic method with double derivatization for the assay of urinary hydroxiprolina. **Journal of chromatographic by biomedics applications**, p. 295-302, 1995.

BOWLER, P. G.; DAVIES, B. J. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. **International Journal of Dermatology**, p. 573-578, 1999.

BROUGHTON, G.; JANNYS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound Healing: An Overview. **Plastic Reconstructive Surgery**, p. 1-32, 2006.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; REIS, F.A.; BECHIOR, A.C.G.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 177- 183, 2006.

CHATTIBI, S.; FERGUSON, M. W. J. Wound repair: an overview. **Inflammation: Basics principles and clinical correlates**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996

DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCEL, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, p. 84-89, 2004.

DIEGELMAN, R.F.; EVANS, M.C.; Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. **Frontiers in Biosciences**. n. 9, v. 1, p. 283-289, 2004

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat model of skin wound healing: an review. **Wound Rep. Regen**. n. 12, p. 591-599.

DYSON, M. Stimulation of tissue by ultrasound – A survey of the mechanism involved. **Physiotherapy**, n. 64, p. 4, 1978.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigation Dermatology**, n.127, p. 514-525, 2007.

FRADE, M. A. C. Úlcera de Perna: Caracterização Clínica e Perfil Imunohistopatológico da Cicatrização na Presença da Biomembrana de Látex Natural da Seringueira Hevea Brasiliensis. **Tese de Doutorado**. Área de Concentração: Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, 2003

GUFFEY, J. S.; WILBORN, J. Effect of combined 405-nm and 880-nm lights on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, n. 6, p.680-683, 2006.

GUFFEY, J. S.; WILBORN, J. In vitro bactericidal effects of 405nm and 470nm blue light. **Photomedicine and Laser Surgery**, n. 6, p. 684-688, 2006.

GUZZARDELA, G. A.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser stimulation on bone defect healing: An in vitro study. **Laser Medicine Sciences**, n.17, p. 216-220, 2002.

HARRIS, D. M. Biomolecular mechanism of laser stimulation, Editorial Comment. **J. Clin. Laser medicine and surgery**, p. 277-80, 1991.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA, K.; KIYAMA-KISHIKAWA; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Laser Med Sci**, n.18, p. 78-82, 2003.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMESE, H. The role of laser influence in cell viability, proliferation and membrane integrity of wounded human skin fibroblast following helium-neon laser irradiation. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 38, p. 74-83, 2006.

HOPKINS, J. T.; McLODA, T. A.; SEEGMILLER, J. G.; BAXTER, D. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: triple-blind, sham-controlled study. **Journal of Athletic Training**. v. 39, n. 3, p. 223-229, 2004.

KARU, T. Primary and secondary mechanism of action of visible to near-IR radiation cells. In: **Journal Photochemical and Photobiology**, n. 49, p.1-17, 1999.

KARU, T. The science of low-power laser therapy. **Gordon & Breach Science**, 1998

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 36, p. 307-314, 2005.

KARUKONDA, S. R.; FLYNN, T. C.; BOH, E. E.; MCBURNEY, E. I.; RUSSO, G. G.; MILLIKAN, L. E. The effects of drugs on wound healing: Part 1. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, n. 39, p. 250-7, 2000.

KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 28, p. 355-364, 2001.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER R. Pathophysiology of Acute Wound Healing. **Clinics in Dermatology**, n. 25 p. 9-18, 2007

LOPES-MARTINS, R. A. B.; MARCOS, R. L.; LEONARDO, P. S.; PIANTRI, J. R. A. C.; MUSCARÁ, M. N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser (Gad-Al-As 655nm) on skeletal muscle fatigue by electrical stimulation in rats. **Journal of Applied Physiology**, n. 101, p. 283-288, 2006.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

MEDRADO, A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R.; ANDRADE ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 32, p. 239-244, 2003.

MENDONÇA, A.C.; FERREIRA, A.S.; BARBIERI, C.H.; THOAMZINE, J.A.; MAZZER, N. Efeitos do Ultra-som Pulsado de Baixa Intensidade Sobre a Cicatrização por Segunda Intenção de Lesões Cutâneas Totais em Ratos. **Acta Ortopédica Brasileira** n. 14 V. 3 p. 152-157, 2006

MUSTOE, T. Understanding chronics wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. **The American Journal of Surgery**, p. 65-70, 2004.

NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M.D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effects of Low Intensity Laser Irradiation on Surgically Created Bony Defects in Rats. **Journal of Oral Rehabilitation**, n. 8, V. 33, p. 619-924, 2006.

NUSSBAUM, E. L.; LIGLE, L.; MAZZULI, T. Effects of 630, 660, 810 and 905nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. **Laser in Surgery and Medicine**, p. 325-333, 2002.

NUSSBAUM, E. L.; LIGLE, L.; MAZZULI, T. Effects of 810nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulation light. **Laser Medicine and Surgery**, p. 343-351, 2002.

NUSSBAUM, E. L.; LIGLE, L.; MAZZULI, T. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal Clinic and Laser Medicine Surgery**, n. 5, p. 283-90, 2003.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAN, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **American Society for Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 334-340, 2005.

POTTER, P. A.; PERRY, A. G. **Fundamentos da enfermagem**: conceitos, processos e prática. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. vol. 2.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n. 4, p. 307-313, 2003.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser Photostimulation accelerates wound healing in diabetics rats. **Wound Repair Regen**, p. 248-255, 2001.

REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Gad-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 33, p. 344-351, 2003.

ROCHA JUNIOR, A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. R. A. A.; RESTRUP, F. M. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. **An Bras Dermatol**, v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

SCHALGER, A.; KRONENBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER, H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635nm and 690nm) and placebo group. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 27, p. 39-42, 2000.

SHAI, A.; MAIBACH, H. I. **Wound healing and ulcers of the skin**- diagnosis and therapy – the practical approach. New York: Springer Heidelberg, 2005

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing – review article. **The New England Journal of Medicine**, n. 2, p. 738-746, 1999.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wound. **American Journal of Surgery**, n. 176 2A, p. 26s-32s, 1998.

TADAKUMA, T. Possible application of the laser in immunobiology. **Keios Journal Medicine**, p. 180-182, 1993.

TIPHLOVA, O., KARU, T. **Crit. Rev. Biomed. Eng.** p. 387-412, 1991.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORN, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Laser and Surgery Medicine**, p. 1-7, 2006.

TURAN, M.; SARAYDYN, S. U.; BULUT, E.; ELAGZ, S.; ÇETINKAYA, O.; KARADAYI, K.; CANBAI, E.; SEN, M. Do vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor promote phenytoin's wound healing effect in rat? An immunohistochemical and histopatologic study. **American Society of Dermatologic Surgery**, n. 30, p. 1303-1309, 2004.

VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. K.; CAMBIER, D. C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Laser and Medicine Science**, n. 18, p. 95-99, 2003.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, 103-113, 2004.

WALKER, M. D.; RUMPF, S.; BAXTER, G.; HIRST, G.; LOWE, A. S. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Laser in Surgery and Medicine**, n. 26, p. 41-47, 2000.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n. 70, p. 38-44, 2003.

WEDLOCK, P.; SHEPHARD, R. A.; LITTLE, C.; MCBURNEY, F. Analgesic effects of cranial laser treatment in two rat nociception models. **Physiol Behav**, p. 445-448, 1996.

YASUKAWA, A.; OHRUI, H.; KOYAMA, Y.; NAGAI, M.; TAKAKUDA, K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. **Journal Veterinary and Medical Science**, v. 69, n. 8, p. 799-866, 2007.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Laser Surgery and Medicine**, p. 56-63, 1997.