Adalberto Vieira Corazza

**Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED
de baixa intensidade na angiogênese de feridas
cutâneas de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidade em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato

São Carlos – SP

2005

Ao meu pai e minha mãe, que me proporcionaram todo o alicerce emocional e intelectual.

À amada esposa, que realizou efetiva participação na introdução da minha vida científica e sempre direcionou todo o seu apoio nas minhas decisões e ações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me orientando, pois vossa sabedoria sempre julgou os momentos ideais e oportunos para desenvolver qualquer atividade na minha vida, e sempre respeitando as minhas capacidades físicas, mentais e espirituais do momento em questão. Por isso, Senhor, sempre confiarei nas suas decisões.

Agradeço aos meus pais, ao meu irmão, aos familiares e principalmente a minha esposa as palavras de incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos.

Serei sempre grato ao meu orientador, Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, por abrir as portas do seu laboratório e de me acolher em sua equipe multiprofissional, os quais estão sendo de grande acréscimo científico na minha vida acadêmica e clínica. As suas orientações e interpretações objetivas fizeram-me desenvolver um raciocínio mais lógico das situações em questão, contribuindo de modo significativo para a minha formação como pesquisador.

Ao professor Dr. Jacks Jorge Júnior, que, com sua incomparável paciência e dedicação, administrou conceitos que colaboraram para o desenvolvimento e para o término deste estudo, além de uma grande aquisição de conhecimentos sobre as técnicas de preparo e análise histológica.

Aos colegas do Grupo de Óptica e Fotônica, que sempre me auxiliaram quando solicitei.

Aos técnicos Adriano e a Ana Godoy, do laboratório de Patologia da FOP de Piracicaba, por toda a orientação e ensino no preparo das lâminas. Agradeço aos alunos de pós-graduação Dawton e ao Fábio Ito a colaboração nas indicações do funcionamento do Programa KS.

Aos colegas do Laboratório de Instrumentação em Microeletrônica da Escola de Engenharia de São Carlos – USP, que contribuíram com o “Programa Área” para calcular a evolução da contração da ferida.

Ao secretário de Saúde, Jordano Zanoni, por toda a contribuição prestada.

Aos professores da Bioengenharia que colaboraram com suas sábias palavras para a evolução da minha didática acadêmica, em especial aos professores Nivaldo Parizotto e Orivaldo L. da Silva. Agradeço também a todos os colegas e funcionários, em especial a Janete dos Santos.

Expresso a todos os meus sinceros agradecimentos.

Pode um homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas suas próprias experiências.

Mansour Chalita

RESUMO

CORAZZA, A. V. (2005). *Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos*. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos.

Os Diodos Emissores de Luz – Light Emitting Diodes – (LEDs) são uma fonte de luz que estão sendo introduzidas comercialmente, mas com discreta base científica nesta modalidade fototerapêutica. O presente estudo comparou os efeitos angiogênicos da luz Laser coerente e colimada à luz LED ausente de coerência e colimação em feridas induzidas em ratos, com fluências diferentes. O modelo experimental consistia da indução de uma ferida circular no quadríceps de 120 ratos, utilizando um “punch” com 15 mm de diâmetro. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: Laser (660 nm) e LED (635 nm), sendo cada um ajustado a 5 J/cm² e 20 J/cm², além do Controle. Após 6 horas da indução das feridas, os grupos tratados recebiam aplicação pontual de contato, e irradiados a cada 24 horas. A angiogênese foi analisada por meio da histomorfometria (H.E), e a contração das feridas pelo Software de Planimetria, sendo estudados os resultados no 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-lesão. Os achados da análise histológica no 3º dia foram determinantes para induzir uma grande eficiência na proliferação de vasos sanguíneos dos grupos tratados em relação ao controle, demonstrando uma taxa próxima da constante no 7º dia, e com discreto aumento no 14º dia, porém com destaque para a tecnologia LED a 5 J/cm² ($p \leq 0,05$). No 21º dia, os grupos fototratados com fluência de 5 J/cm² apresentavam valores estatísticos com maior eficiência na angiogênese quando comparados com o grupo Laser a 20 J/cm², sugerindo que fluências elevadas podem induzir um processo do tipo saturação. Não ocorreu diferença da neovascularização no centro e nas margens da ferida ($p \leq 0,05$), sugerindo que ocorria uma fotobiomodulação de toda a lesão, favorecendo o crescimento homogêneo dos vasos sanguíneos. Tanto o Laser quanto o LED não apresentaram resultados significativos na redução da área das feridas. As fototerapias a Laser e LED de baixa intensidade sugeriram que a coerência e a colimação não eram fatores decisivos para induzir alterações nas funções celulares, e sim a banda de absorção do espectro eletromagnético. Ambas as fonte de luz vermelha ajustadas a fluências de 5 J/cm² podem demonstrar resultados expressivos no estímulo angiogênico em pele lesada.

Palavras-chave: angiogênese, contração de feridas, cicatrização, Diodos Emissores de Luz (LEDs), Laserterapia de Baixa Intensidade (LLLT), histomorfometria.

ABSTRACT

CORAZZA, A. V. (2005). *Comparative fotobiomodulation between the LED and low intensity laser in the angiogenesis of skin wounds in rats*. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos.

The Light Emitting Diodes (LEDs) are a source of light that have been commercially introduced, but still with a lack in its scientific basis in this phototherapeutic modality. The present study compared the angiogenic effects of the laser and LED illumination in induced wounds in rat, with fluencies different. The experimental model consisted of the induction of a circular wound on the quadriceps of 120 rats, using a “punch” with 15 mm diameter. Animals were divided randomized in 5 groups: Laser and LED each device with a dosage of 5 J/cm² and 20 J/cm², and Control. After 6 hours of the induction of the wounds, the treated groups received contact of punctual application, and irradiated every 24 hours. The angiogenesis was studied through the histomorphometric (H.E) and the wounds contraction was photographed and analyzed in the planimetric software in the 3rd, 7th, 14th and 21st lesion induced days. The discoveries of the histological analysis in the 3rd day revealed larger efficiency in the proliferation of the blood vessels in all irradiated groups in comparison to controls, being a rate near of the constant in the 7th day, following to discreet improves in the 14th, even so with prominence for the LED with 5 J/cm². In the 21st day, the groups phototreatment with fluence of 5 J/cm² showed similar statistically values in the larger efficiency in the angiogenesis, when to compare to Laser with 20 J/cm², suggesting high fluencies can induced a saturation process. The average of the area reduction of the wound didn't present similar statistician values of the treated groups in relation to the control ($p \leq 0,05$). The phototherapeutic Laser and LEDs of low intensity they suggested that the coherence and the collimation were not decisive factors to induce alterations in the cellular functions, but the band of the spectrum electromagnetic. The both red source of light agreements to fluencies of the 5 J/cm², they can demonstrate expressive results in the incentive ulcerated skin angiogenic.

Words-key: angiogenesis, wounds contraction, cicatrization; Lights Emitting Diodes (LEDs), Low Energy-Level LaserTherapy (LLLT), histomorphometry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sistema tegumentar.....	18
FIGURA 2. Fases da cicatrização de feridas.....	19
FIGURA 3. Cascata de eventos angiogênicos.....	24
FIGURA 4. Cavidade óptica ou Cavidade ressonântica.....	29
FIGURA 5. A luz coerente.....	30
FIGURA 6. Diodo Emissor de Luz.....	32
FIGURA 7. Distribuição da energia do LASER e do LED por banda espectral.....	33
FIGURA 8. Absorção da luz nas células sanguíneas.....	34
FIGURA 9. Profundidade de penetração dos comprimento de onda na pele.....	35
FIGURA 10. A) LED Terapêutico. B) Feixe de luz do LED C) Diâmetro do feixe de luz.....	46
FIGURA 11. Laser Terapêutico. B) Feixe de luz do Laser. C) Diâmetro do feixe de luz Laser.....	47
FIGURA 12. Organograma da fototerapia.....	48
FIGURA 13. Ilustração da área irradiada com os tratamentos fotônicos.....	49
FIGURA 14. Tratamento fotônico dos animais.....	50
FIGURA 15. Indução mecânica da ferida.....	51
FIGURA 16. Densidade de volume no retículo sobre o corte histológico.....	53
FIGURA 17. Média porcentual da contração das feridas (3, 7, 14 e 21 dias).....	55
FIGURA 18. Densidade de volume dos vasos sanguíneos dos grupos analisados no experimento ao longo dos dias (3, 7, 14 e 21 dias).....	57
FIGURA 19. Densidade de volume dos vasos sanguíneos dos grupos LED com fluências de 5 e 20 J/cm e Controle.....	57
FIGURA 20. Densidade de volume dos vasos sanguíneos dos grupos Lasers e Controle com fluências de 5 e , 20 J/cm ²	58
FIGURA 21. Densidade de volume dos vasos sanguíneos dos grupos LED e Laser com fluências de 5 J/cm ² , e CONTROLE.....	59
FIGURA 22. Média da densidade de volume nas margens e no centro da ferida. A) 3 dias; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 21 dias.....	60
FIGURA 23. Fotografias histológicas analisando a neovascularização com aumento de 400X – (A) LASER a 5 J/cm ² ; B) LED a 5 J/cm ² ; C) LED a 20 J/cm ² ; D) LASER a 20 J/cm ² ; E) Controle.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contração relativa da ferida ao longo do experimento, em porcentagem, na média das medidas, mensurada pelo Programa Área.....	55
Tabela 2. Teste de Tukey para densidade volumétrica dos vasos sanguíneos.....	56
Tabela 3. Teste-t para comparação das médias da densidade de volume dos vasos sanguíneos nas margens e no centro da ferida.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ca^{++}	Íon cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
C.E	Células Endoteliais
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECF-A	Fatores quimiotáticos eosinofílicos de anafilaxina
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
He-Ne	Hélio-Neônio
Ga-Al-As	Arsenieto de gálio-alumínio
Ga-As	Arsenieto de gálio
LASER	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação
LED	Diodo emissor de luz
LEDLLT	Ledterapia de baixa intensidade
LLLT	Laserterapia de baixa intensidade
MMP	Matriz metaloproteinase
NCF	Fator quimiotático neutrofílico
NO	Óxido nítrico
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Ânion superóxido do oxigênio
ROS	Espécies de Oxigênio Reativo
SOD	Superóxido Dismutase
USP	Universidade de São Paulo
UNICAMP	Universidade de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Aspectos Gerais.....	13
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1. Principal.....	15
1.2.2. Secundários.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. O Sistema Tegumentar.....	16
2.2. A Reparação Tecidual.....	18
2.2.1. Fase de Inflamação.....	19
2.2.2. Fase Proliferativa.....	21
2.2.3. Angiogênese: Como os novos vasos sanguíneos crescem?.....	22
2.2.4. Fase de Remodelagem.....	24
2.3. O Laser Terapêutico de Baixa Intensidade.....	25
2.4. Princípios do Sistema Operacional Laser.....	27
2.5. Propriedades e Comportamento da Radiação Laser.....	29
2.6. O LED Terapêutico de Baixa Intensidade.....	30
2.7. Princípios do Sistema Operacional LED.....	31
2.8. Propriedades e Comportamento da Radiação LED.....	32
2.9. Mecanismos de Ação Fotobiofísico Universal.....	34
2.10. Laser e LED na Reparação Tecidual.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Animais de Experimentação.....	45
3.2. LED Utilizado.....	45
3.3. LASER Utilizado.....	46
3.4. Fototerapia.....	47

3.5. Indução das Feridas Cutâneas.....	50
3.6. Sacrifício dos Animais.....	51
3.7. Análise Macroscópica.....	51
3.8. Histomorfometria.....	52
3.9. Análise Estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Análise da Contração da Ferida por Planimetria Computadorizada.....	54
4.2. Histomorfometria da Angiogênese.....	56
4.3. Histomorfometria Vascular do Centro e das Margens da Ferida.....	60
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1. Contração da Ferida.....	62
5.2. Angiogênese.....	65
6. CONCLUSÕES.....	72
6.1. Sugestões para trabalhos futuros.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8. ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais.

Alterações na integridade da pele, conhecidas como úlceras agudas ou crônicas, constituem um sério problema de saúde pública no Brasil. Embora sejam escassos os registros clínicos desses pacientes, sabe-se que é grande o número de doentes, além da dificuldade de recuperação dessas patologias (PEREIRA, 2002). Nos Estados Unidos, estima-se que aproximadamente 2 milhões de pessoas sofram de algum tipo de ferida crônica, onerando o tratamento em bilhões de dólares anuais (CHEN, 1999). GUPTA *et al.* (2004) desenvolveram um estudo epidemiológico em duas comunidades na Índia (uma urbana e a outra rural), e verificaram que a prevalência de feridas aguda e crônica foi 10,55 e 4,48 por 1.000 habitantes respectivamente, e que a maior incidência das feridas ocorria nos membros inferiores.

Soluções para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que são acometidos por deficiências no processo de reparação tecidual têm sido investigadas. Técnicas farmacológicas (ZHAO *et al.*, 2002; DOWSETT, 2004; SENNEVILLE, 2005), fitoterapêuticas (PAIVA, 2002), mecânicas (LOK *et al.*, 1999), terapias gênicas (ISHII *et al.*, 2004) e exercícios fisioterapêuticos (TANAKA *et al.*, 1996; BERARD *et al.*, 2002) são utilizadas para o tratamento de úlceras cutâneas agudas e crônicas. Do mesmo modo, existem recursos físicos não-invasivos que auxiliam na contração de feridas na pele (McDIARMID *et al.*, 1985; CHU *et al.*, 1996; BAXTER *et al.*, 1991; MILGRAM *et al.*, 2004).

Entre os recursos mais utilizados nas últimas décadas, a Laserterapia de baixa intensidade (LLLT) tem auxiliado a cicatrização de feridas por meio dos seus efeitos biomoduladores (BAXTER, 1994; ROMANOS, 1995; BISHT, 1999; TAM, 1999; CAPON, 2001; SIMUNOVIC, 2000; WOODRUFF, 2004). No processo de reparação

tecidual, a terapia fotônica interage em cada uma das três fases, proporcionando respostas positivas em cada uma delas (YU, 1997). Na fase inflamatória ocorre a fotobiomodulação celular, ou seja, ao mesmo tempo em que se reduz o número de células inflamatórias (CARVALHO, 2001), estimula-se a sua funcionalidade para produzir fatores de crescimento (WHELAN, 2001), iniciando assim a segunda fase, denominada de proliferativa. Nesta segunda etapa, ocorre a neoformação de vasos sanguíneos pela fotoestimulação das células endoteliais (KIPSHIDZE, 2001), e proliferação de fibroblastos e conseqüente deposição de colágeno (REEDY, 2001; REEDY, 2003), colaborando para a maior formação do tecido de granulação e para a efetiva contração da ferida. E na última fase do processo de reparação ocorre a remodelação do tecido, que consiste na reorganização dos vasos sanguíneos e das fibras de colágeno (YU, 1997; REED, 2003). A angiogênese exerce elevada influência desde o início do processo de cicatrização das feridas, atuando na remoção de detritos, e restabelecendo o suprimento de oxigênio e nutrientes do novo tecido, favorecendo o aumento da taxa metabólica e conseqüente crescimento das células (AGAIBY, 2000; WHELAN *et al.*, 2001). Benéficos resultados têm sido obtidos com a interação da luz terapêutica vermelha na neoformação de vasos sanguíneos nos estudos “*in vitro*” (AGAIBY, 2000; KIPSHIDZE, 2001; SCHINDL, 2003) e “*in vivo*” (AMIR *et al.*, 2000).

Além do comprimento de onda, a LLLT possui outras variáveis para modular a atividade celular, como fluência, potência, tempo de tratamento, e irradiância. Devido à grande quantidade de parâmetros da fonte de luz laser, já houve certo ceticismo na aplicação da fototerapia (LAGAN *et al.*, 2001; LUCAS *et al.*, 2002). Atualmente, a discussão está sendo vinculada às variáveis da luz, como a coerência e a colimação. Isso vem ocorrendo devido à introdução de algumas pesquisas utilizando a luz LED como substituta da luz Laser.

As fontes Laser e LED são semelhantes do ponto de vista da luz emitida, ou seja, ambos produzem uma banda espectral relativamente estreita, embora o LED tenha espectro um pouco mais largo. A diferença básica dessas fontes está no fato de que a luz emergente do LED não é colimada nem coerente. Apesar desses contrastes, a Ledterapia de baixa intensidade (LEDLLT) está sendo justificada como alternativa à LLLT para promover a cicatrização de feridas (Al-WATBAN *et al.*, 2003; WHELAN *et al.*, 2003; VINK *et al.*, 2003), além de atuar de modo eficiente em outras condições fisiológicas e patológicas (WONG-RILEY *et al.*, 2001; WEISS *et al.*, 2005). A procura de respostas

positivas dos efeitos do LED pode também estar associada ao baixo custo desse equipamento em relação ao Laser. Porém alguns estudos afirmam a ineficiência dessa fonte de luz ausente de coerência (BIHARI *et al.*, 1989; BERTOLONI *et al.*, 1993; PÖNTINEN *et al.*, 1996).

Apesar da atual discussão da luz, a dose de energia é uma interrogação para vários pesquisadores e clínicos. No que tange o limiar energético de biomodulação, há várias controvérsias. Os Lasers e LEDs com diferentes doses de energia produzem determinados efeitos sobre os vasos sanguíneos da pele. Vários estudos seguem a fototerapia fundada na curva Básica de Arndt-Shultz como ideais para estimular a produção de células endoteliais e conseqüente angiogênese (AGAIBY *et al.*, 2000; KIPSHIDZE *et al.*, 2001, SCHINDL, 2003), além da produção de fibroblastos e colágeno (REDDY *et al.*, 2001, PEREIRA *et al.*, 2002; REDDY, 2003). Por outro lado, alguns autores justificam a utilização de fluências elevadas para fotomodular a cicatrização de feridas (AL-WATBAN *et al.*, 1997; AL-WATBAN *et al.*, 1999).

1.2. Objetivos

1.2.1. Principal

- Analisar a eficiência fotobiomoduladora do LED em relação ao Laser.

1.2.2. Secundários

- Verificar a contração das feridas dos ratos nas fases de reparação tecidual (3º, 7º, 14º e 21º dias) com os tratamentos fotônicos coerente e incoerente;
- Avaliar comparativamente os efeitos angiogênicos nas fases de reparação tecidual (3º, 7º, 14º e 21º dias) das fototerapias biomodulantes LED e Laser de Baixa Intensidade nas feridas cutâneas induzidas mecanicamente em ratos;
- Analisar a fluência adequada (5 J/cm² ou 20 J/cm²) na contração da ferida e na angiogênese da pele com o comprimento de onda vermelho nas fontes LED e Laser de baixa intensidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Sistema Tegumentar

O revestimento externo do corpo constitui o chamado tegumento comum. Fazem parte deste sistema a pele, seus anexos e a camada subcutânea ou hipoderme (Figura 1). A pele se constitui em um dos maiores órgãos, sendo responsável por aproximadamente 16% do peso corporal. ZORZETTO (1995) afirma que este órgão varia de modo notável em diferentes áreas do corpo, tendo uma espessura de 0,5 mm nas pálpebras e de 4 mm nas regiões palmo-plantares.

Com múltiplas funções, este grande órgão atua na função de proteção do organismo contra agentes físicos, químicos e infecciosos (bactérias), além de prevenir a eliminação excessiva de água por evaporação, ou o seu ganho. Funciona como sistema refrigerador, uma vez que as glândulas sudoríparas secretam um fluido para resfriar o corpo, enquanto os pêlos e uma camada subjacente de gordura isolam contra o frio (SILVERTHORN *et al.*, 2003).

Os vasos sanguíneos existentes, além de conduzirem os fatores nutricionais e oxigênio para os tecidos, também influenciam a regulação térmica. Em repouso a pele contém cerca de 20 vezes mais sangue do que seria necessário para a nutrição tecidual, favorecendo a perda de calor para a superfície (LOW e REED, 2001). Em caso de frio, ocorre uma vasoconstrição mantendo o calor corporal e, em situações de calor, acontece a vasodilatação. A existência de uma trama de receptores sensoriais no tecido cutâneo possibilita a organização dos estímulos de sensibilidade para o córtex cerebral (AIRES *et al.*, 1999).

A pele é composta de três camadas, denominadas de epiderme, derme e hipoderme, sendo as duas primeiras as principais. Cada uma delas é formada por tecidos diferenciados e funções distintas. (SAMPAIO e RIVITTI, 2001; SMELTZER e BARE, 1998).

A epiderme, camada mais externa da pele, é composta de proteínas fibrosas denominadas de queratina. Na diferenciação epidérmica, há, também importante participação da derme através de inter-relações entre fibroblastos e queratinócitos (sintetizadores de queratina). A modulação da diferenciação epidérmica é influenciada por meio de fator de crescimento epitelial (EGF), fator transformador de crescimento (TGF- α), fator transformador de crescimento de queratinócitos (KGF), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), interleucinas (IL-1a , IL-6, IL-8), GM-CSF, vitamina A, retinóides e chalonas (SAMPAIO e RIVITTI, 2001). A epiderme é constituída por cinco subcamadas: o estrato córneo, mais externo; o estrato lúcido; o estrato granuloso; o estrato espinhoso; e a camada mais interna, o estrato germinativo, ou camada de células basais, as quais ligam a epiderme à derme. As células basais estão unidas entre si e às células espinhosas suprajacentes, e estas entre si, mediante as chamadas pontes intercelulares (desmossomas). Os desmossomas são proteínas ancorantes localizadas entre as células e que dão suporte ao epitélio. As células da epiderme e as fibras da derme estão ancoradas umas nas outras por intermédio de fibras protéicas que atravessam a membrana basal.

A derme é a segunda e mais espessa camada da pele. Sua função é oferecer resistência, suporte, sangue rico em nutrientes e oxigênio à pele. É composta por duas camadas: a papilar e a reticular. A derme papilar repousa diretamente abaixo da epiderme, sendo composta primariamente por células de fibroblasto capazes de produzir uma forma de colágeno, componente do tecido conjuntivo. A camada reticular dispõe-se sob a camada papilar e também produz colágeno e fibras elásticas. O colágeno e a elastina proporcionam resistência à pele e são responsáveis pelo rechaço cutâneo. A derme também se constitui de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas sudoríparas e sebáceas e raízes pilosas (Figura 1). Espessos feixes de colágeno ligam a derme ao tecido subcutâneo e às estruturas de suporte subjacentes, como fáscia, músculos e ossos.

A camada ou tela subcutânea é composta de tecidos adiposo e conjuntivo, além de grandes vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. A espessura da epiderme, da derme e da tela subcutânea varia entre diferentes pessoas e partes do corpo, exercendo, assim, forte ação protetora para o corpo humano diante de agentes agressores.

FIGURA 1. Sistema Tegumentar

FONTE: JOHNSON, J.G. (2003). *Biology II: anatomy & physiology*. Frederick: Frederick High School. Cap.46, Section 4. Disponível em:<<http://www.sirinet.net/~jgjohnso/integproject.html>>. Acesso em: 27 Feb. 2005.

2.2. A Reparação Tecidual

O processo de reparo pode ser caracterizado por regeneração, na qual existe um reparo gradual do defeito pela proliferação das células do mesmo tipo das destruídas, ou pode ser por reposição com células de outro tipo, geralmente tecido conjuntivo, resultando na formação de cicatriz. O reparo, ou seja, a reação de cicatrização, é um processo complexo, mas essencial, sem o qual seria improvável a sobrevivência do organismo. A cicatrização envolve ações integradas das células, matriz e mensageiro químico, e visa restaurar a integridade do tecido com a maior rapidez possível e com maior força tênsil. A reparação não é um simples processo linear no qual fatores de crescimento disparam a proliferação celular, e sim uma integração de processos dinâmicos, que envolvem mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas.

A reparação tecidual, que é comum a todos os tipos de tecidos do organismo, pode ser dividida em três fases caracterizadas por inflamação, proliferação e remodelagem. A exata duração de cada fase não é distinta, devido às fases se

sobreporem e também pela variabilidade de um caso para outro. Entretanto existem efeitos temporais prefixando a duração de cada fase (REED, 1996).

FIGURA 2: Fases da cicatrização de feridas

FONTE: COTRAN, R.S. et al (2000). *Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*.

2.2.1. Fase de Inflamação

A fase inflamatória na cicatrização da ferida é considerada um processo preparatório para a formação do novo tecido. É, em geral, decorrente de uma lesão ou doença causada pela interrupção na fisiologia normal de um tecido. Essa fase estende-se do 1º ao 10º dia (REED, 1996).

A perda de sangue tecidual ativa as plaquetas e a coagulação sanguínea, para limitar o extravasamento de sangue no tecido. O coágulo sanguíneo proporciona uma matriz provisória, que facilita a migração das células até a ferida. (KITCHEN, 1998). O estágio inicial da inflamação é caracterizado por mudanças vasculares, após a ruptura de vasos sanguíneos. Ocorre vasoconstrição, com depósito de um coágulo fibrinoplaquetário na tentativa de controlar a hemorragia. Essa reação dura de 5 a 10 minutos, e é seguida de vasodilatação das vênulas. A microcirculação perde sua capacidade de vasoconstrição, uma vez que a norepinefrina é destruída pelas enzimas intracelulares. Além disso, são liberadas numerosas substâncias vasoativas como a histamina, serotonina e prostaglandina, facilitando a permeabilidade vascular, durante dois a três dias, promovendo os sinais cardeais de inflamação como dor, calor, rubor, edema e redução da função.

As células inflamatórias têm um importante papel durante a cicatrização de feridas, contribuindo para a liberação de enzimas lisossômicas e produtos de oxigênio, bem como facilitando a limpeza de debris tecidual e bactérias (MEDRADO *et al.*, 2003). Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a chegar ao local da lesão. Essas células migram em resposta a uma ampla variedade de estímulos químicos e mecânicos, inclusive produtos oriundos do mecanismo de coagulação, a presença de bactérias, e fatores derivados das células. A principal ação dos neutrófilos é a fagocitose, além de serem expressiva fonte de espécies de oxigênio reativo (ROS) (FUJIMAKI *et al.*, 2003). Em níveis normais, ROS (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, oxigênio simples) é de fundamental importância para a síntese protéica, ácidos nucléicos e uma ampla variedade de espécies moleculares, mas em concentrações excessivas promovem elevada ação inflamatória. (KARU *et al.*, 1995). Os monócitos migram do interior dos vasos sanguíneos até o espaço tecidual e diferenciam-se em macrófagos. A presença de fibronectina insolúvel, tecido hipóxico, agentes quimiotáticos, lipopolissacarídeos bacterianos e interferons são prováveis fatores de atração desses leucócitos. Os macrófagos atuam auxiliando os neutrófilos na fagocitose de microrganismos invasores, resíduos de tecidos e de células que estejam morrendo (incluindo neutrófilos). A atuação dos macrófagos ocorre entre 2 e 5 dias após a lesão. Os mastócitos participam em todas as fases da cicatrização e são células secretoras especializadas que, em estado de repouso, contêm grande quantidade de grânulos que estão dispersos pelo citoplasma. A matriz do grânulo é composta por um complexo heparina-protéico, no qual grupos carboxílicos protéicos servem de receptores da histamina. Outras substâncias encontradas nos grânulos de mastócitos incluem a glucuronidase, ácido-fosfatases, uma variedade de proteases, fatores quimiotáticos eosinofílicos de anafilaxina (ECF-A) e fator quimiotático neutrofílico (NCF) que podem estar envolvidos na resposta do corpo em lesões. A histamina, por exemplo, pode em baixas doses estimular a formação de colágeno e cicatrização, enquanto a heparina estimula a migração de células endoteliais. Já ECF-A e NCF podem modular o processo inflamatório, agindo como quimio-atraentes para células envolvidas em fases posteriores do processo de reparo. O processo de degranulação de mastócitos, mediante a liberação dessas substâncias, poderá estimular a reparação tecidual (EL SAYED e DYSON, 1996). Os mastócitos, assim como os eosinófilos, são encontrados em maior concentração no tecido conjuntivo da pele, pulmões e trato gastrointestinal. Nesses locais, eles interceptam os patógenos que são inalados ou ingeridos, ou aqueles que

entram através de rupturas da epiderme (SILVERTHORN *et al.*, 2003). Células imuno-inflamatórias (leucócitos) semelhantes a neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos-T são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento que controlam o funcionamento de outras células e regulam o processo de angiogênese e fibroplasia. (AGAIBY *et al.*, 2000).

2.2.2. Fase Proliferativa

A fase proliferativa comumente ocorre do 3º ao 20º dia (REED, 1996). Nas feridas há a possibilidade de visualizar o tecido de granulação, um tecido vermelho, brilhante, com aspecto de carne viva e granulosa. Esse tecido consiste em macrófagos, fibroblastos, colágeno imaturo, vasos sanguíneos e substância matricial. Os macrófagos permanecem ativos nesta fase, desenvolvendo a atividade de fagocitose e auxiliando na liberação de fatores de crescimento, juntamente com as plaquetas. À medida que o tecido de granulação prolifera, os fibroblastos estimulam a produção de colágeno, que proporciona ao tecido sua força de tensão e, em última instância, sua estrutura.

O fenômeno de fibroplasia é caracterizado pela proliferação de fibroblasto, que é o principal responsável pela deposição da nova matriz. O ácido hialurônico é um importante agente na proliferação dos fibroblastos, facilitando a sua motilidade. Os glicosaminoglicanos são moléculas altamente negativas, devido à grande quantidade de radicais sulfato (dermatansulfato, condroitin-sulfato, e heparansulfato), com exceção do ácido hialurônico, que permite a atração de cátions, principalmente sódio, estimulando a ação osmótica de uma grande quantidade de água, formando um gel hidratado e semifluídico que permite a circulação, nos tecidos conjuntivos, de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos que também atuam na regulação da motilidade e crescimento dos fibroblastos. Dessa forma, os fibroblastos iniciam a deposição de colágeno para formar uma estrutura de vedação sobre a parte danificada e cria a matriz extracelular de uma ferida. (KITCHEN, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000; STARKEY, 2001).

Na matriz extracelular as proteínas estruturais mais importantes são as fibras de colágeno, as quais são formadas por fibrilas. Essas fibrilas são compostas por uma cadeia de tripla hélice de aminoácidos conhecidos como tropocolágeno (REED, 1996). DE ROBERTIS e HIB (2001) afirmam que existem aproximadamente 25 classes de

tropocolágeno. Em todas elas um terço dos aminoácidos são glicinas, outro terço é composto por prolinas e hidroxiprolinas e o terço restante constitui outros tipos de aminoácidos. Tais cadeias peptídicas se combinam de diversas maneiras, o que resulta em 15 diferentes tipos de fibrilas de colágeno, sendo os principais do tipo I, II, III, IV, VII, IX e XI. A proliferação é marcada pela presença de colágeno do tipo III, que produz parte da membrana basal ao promover lesão cutânea, e o colágeno do tipo V, que é depositado em torno das células, formando uma sustentação estrutural. Na fase de proliferação inicia-se o processo de contração da ferida, que é desenvolvido principalmente pelos fibroblastos ricos em actina, sendo conhecidos como miofibroblastos. Esses fibroblastos acumulados nas margens das feridas executam umas atividades contráteis, puxando as bordas das feridas para o centro. Sendo assim, ocorre uma “força de tração” sobre as fibras da matriz extracelular (REED, 1996)

Segundo STARKEY (2001), a velocidade e a qualidade da cicatrização são reguladas pela quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) produzido. O ATP é a fonte primária de energia da célula e é fundamental para fornecer a energia metabólica necessária para restaurar as propriedades da membrana celular, sendo realizado por meio da entrada e saída de sódio e potássio da célula, para construir e sintetizar novas proteínas.

2.2.2.1. Angiogênese

O processo de reparação se inicia na periferia, onde os macrófagos e os polimorfonucleares podem suportar um ambiente pobre em oxigênio, onde produzem novos leitos capilares e colaboram para a formação do tecido de granulação. A formação de novos vasos sanguíneos ocorre por meio de uma série de eventos em cascata que dependem, em primeiro lugar, da ativação das células endoteliais (Figura 2). As células endoteliais de preexistência próxima aos vasos sanguíneos possuem receptores específicos. O processo de ativação dessas células decorre da adesão dos fatores de crescimento angiogênicos a estes receptores. Vários fatores de crescimento relacionados, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), promovem o estímulo de neoformação de vasos sanguíneos. BECIT e AKIN (2001) verificaram em seus estudos que o VEGF é um dos mais importantes fatores de crescimento angiogênicos. A angiogênese também é

controlada por um equilíbrio de citocinas angiogênicas (TGF- β , TNF- α ; IL-8) e antiangiogênicas (angiostatina e endostatina). Segundo AIRES *et al.* (1999), a resposta das células endoteliais aos fatores angiogênicos é mediada através de sistemas de mensageiros intracelulares secundários, como o cálcio, proteínas quinases, adenilciclase (proteína de membrana), e monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). As células endoteliais estimuladas promovem sinais aos núcleos para uma nova produção molecular, inclusive de enzimas proteolíticas (ativadores plasminogênicos, collagenase, gelatinase e estromelisina). Essas enzimas vão dissolver a membrana basal em minúsculos orifícios de todos os vasos sanguíneos adjacentes à lesão. As células alinham-se, formando umas configurações bipolares, seguidas de divisão mitótica (proliferação) que ocorre após 24 a 48 horas. As células endoteliais migram dos orifícios dos vasos preexistentes em direção aos tecidos doentes, uma vez que é de fundamental importância que o tecido receba nutrientes e oxigênio. Moléculas especializadas chamadas de moléculas de adesão, ou integrinas, estimulam a germinação de novos vasos sanguíneos.

Outras enzimas (metaloproteinase de matriz, ou MMP) são produzidas para dissolver o tecido necrótico ao redor da germinação dos vasos e para organizar a sua disposição. JORGENSEN (2003), após a inserção no tecido subcutâneo de tubos de poli-tetrafluoroetileno, encontrou uma correlação significativa e inversa entre MMP-9 e os níveis de acumulação de colágeno 10 dias após o implante do tubo na ferida. A germinação das células endoteliais proporciona a formação de um tubo no vaso preexistente nas margens da ferida. Esse tubo, em contato com o leito da lesão, desenvolve uma alça, retornando ao vaso preexistente, permitindo nova circulação sanguínea no tecido em reparação. Finalmente, os tubos de vasos sanguíneos neoformados são envolvidos por fibroblastos, que posteriormente se desenvolvem em células musculares lisas. Essas células de músculos lisos especializados, denominadas perícitos, estabilizam o desenvolvimento da angiogênese. Os perícitos circundam os capilares formando uma espécie de camada externa entre endotélio e o fluido intersticial. A estabilização da neoformação de vasos sanguíneos é de suma importância para evitar o surgimento de um número excessivo de vasos.

Manifestação angiogênica excessiva pode indicar um desequilíbrio dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos, comum nas neoplasias. A perfusão do sangue nos tecidos ocasiona elevação do nível da oxigenação e, ao mesmo tempo, os fibroblastos depositam novas fibras de colágeno para proporcionar uma estrutura de suporte (LOW e

REED, 2001). JONSSON *et al.* (1991) sugerem que a média de perfusão e a tensão de oxigênio são fatores determinantes para a deposição do colágeno. Segundo descreveu CARVALHO (2002), a molécula helicoidal de procolágeno somente se formará e será liberada para o espaço extracelular na presença de oxigênio suficiente. HESS (2002) afirma que a epiteliação só é possível na presença de tecido vascular viável.

FIGURA 3. Cascata de eventos angiogênicos

FONTE: The Angiogenesis Foundation (2000)
http://www.angio.org/understanding/content_understanding.html. Acessado em 28/11/2004.

2.2.3. Fase de Remodelagem

ROMANOS *et al* (1995), evidenciaram que durante a fase proliferativa o colágeno do tipo III está em maior quantidade em relação ao colágeno do tipo I, entretanto na fase de remodelação as quantidades de colágeno ficam equilibradas. KITCHEN e YOUNG (1998), afirmam que a tendência é a reposição parcial do colágeno do tipo III pelo tipo I (colágeno fibrilar maduro). Vários autores confirmam

que nesta última etapa, as fibras colágenas tornam-se mais espessas e orientadas em paralelismo, resultando em maior resistência tênsil do tecido (REED, 1996; SAMPAIO E RIVITI, 2001). Os fatores implícitos no processo de remodelagem do tecido não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que o tipo de tensão aplicada sobre as feridas afetará a sua remodelagem. Sendo assim, este fenômeno envolve um efeito piezoelétrico, que é uma mudança elétrica induzida ao longo das fibras colágenas, que irá promover orientações paralelas sobre as linhas de estresse do tecido (REED, 1996). A resistência da ferida à ruptura aumenta com a deposição de colágeno, atingindo aproximadamente 20% da resistência normal por volta do 21º dia. A resistência final atingida se situará na região de 70 a 80% do valor normal.

2.3. O Laser Terapêutico de Baixa Intensidade

A luz terapêutica corresponde a uma pequena porção do espectro de radiação eletromagnético total, e compreende os comprimentos de onda do visível ao infravermelho próximo (300 nm a 1.100 nm) (ANDERS, 1993). A energia contida nesses espectros é transmitida por unidades denominadas fótons. Um fóton contém um quantum. Isso é expresso pela equação $E = hc/\lambda$, enunciada por Max Planck em 1900, em que h é a constante de Planck ($1,585 \times 10^{34}$ cal/seg), c é a velocidade da luz (3×10^{10} cm/seg), e λ é o comprimento de onda de radiação. Dessa equação, deduz-se que os fótons com comprimento de onda mais curto têm maior energia (De ROBERTS e HIB, 1998). Por volta de 1917, Einstein tinha formulado a Teoria de Emissão Estimulada, sendo apoiado nos conceitos da teoria quântica de Planck. O advento e o estímulo para desenvolver pesquisas sobre uma tecnologia fotoestimuladora do metabolismo celular provavelmente ganharam dimensões iniciais com o estudo do biólogo russo Alexander Gurwitsch, que publicou em 1923 sua descoberta fundamental intitulada “O fenômeno da indução biológica”. O autor descreveu a indução de um processo biológico de uma espécie para outra, observando que células vivas emitiam uma radiação eletromagnética atômica, que é muito próxima à irradiação Ultravioleta em termo de comprimento de onda. Assim, uma luz emitida por um sistema biológico (bioluminescência) e de baixa intensidade pode induzir um processo biológico semelhante à mitose. Ele nomeou de irradiação mitogenética (SIMUNOVIC, 2000). A partir de então, várias investigações sobre a possibilidade de irradiação luminosa

mitogenética artificial foram estimuladoras para justificar a teoria proposta por Einstein em 1917, e para desenvolver estudos na administração da laserterapia.

Em 1953, uma interessante emissão estimulada reapareceu com o advento da amplificação das microondas. Radiações de microondas, ou ondas centimétricas, são ondas eletromagnéticas que possuem propriedades ópticas; as quais são refratadas, difratadas, e refletidas, e podem ser focadas por lentes apropriadas. Com o desenvolvimento dos MASERS, que é um acrônimo para Microwave Amplifiers by the Stimulated Emission of Radiation (amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação), surgiram especulações a respeito da possibilidade de estender estes princípios na amplificação e geração na região da radiação visível (SNYDER-MACKLER e SEITZ, 1990). Seguindo as teorias formuladas anteriormente, Theodore Maiman em 1960 converteu este conhecimento em realidade e criou o primeiro laser a rubi operando em 694,3 nm, justificando o acrônimo LASER, como Light Amplification Stimulation Emission Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação). A partir de então, várias fontes de luz Lasers foram desenvolvidas sendo aplicadas desde “apontadores” de laser e código de barra até dispositivos militares, como visores para determinação de distância e sistemas de definição de alvos. (BAXTER, 1994).

Os Lasers da alta potência (1 a 100W) foram rapidamente introduzidos na medicina, inicialmente em cirurgias oftalmológicas. Até o presente momento, as aplicações médicas têm por base as propriedades fotodérmicas e fotoablativas do laser com o tecido, sendo utilizados para cortar, soldar, e mesmo destruir tecidos (AMIR, 2000). Alguns estudos confirmam que, após realizar cirurgias com Lasers, em substituição ao bisturi metálico, existia uma maior síntese de colágeno e maior força de tensão dos tecidos (ROSSMANN *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 1997; ROMANOS *et al.*, 1995; FINSTERBUSH *et al.*, 1985).

Em 1960, Javan, Bennett, e Herriott desenvolveram o laser de Hélio-Neônio (He-Ne) (SNYDER-MACKLER e SEITZ, 1990), e Johnson, o de Neodímio-Ítrio-Alumínio-Granada (Nd-YAG). Em 1961, Patel e colaboradores apresentaram o laser de dióxido de carbono, que emitia radiação na faixa infravermelha do espectro eletromagnético, e o laser de argônio com seu duplo espectro de emissão (GENOVESE, 2000).

O laser terapêutico de baixa intensidade, com potência menor ou igual a 500mW (BRAVERMAN, 1989), ganhou aplicabilidade clínica após os estudos experimentais

realizados pelo grupo de pesquisa do professor Endre Mester em Budapeste, no final da década de 60 e início dos anos 70. Ele trabalhou com a cicatrização de feridas e verificava a efetividade dos resultados mediante análises histológicas, imunológicas e testes funcionais. Os resultados demonstraram melhora da síntese de colágeno, indução da neovascularização e melhora da síntese de enzimas em toda a área irradiada (BAXTER, 1994; SIMUNOVIC, 2000).

No final da década de 70, surgiu uma nova tecnologia laser à base de diodo, operando no espectro infravermelho próximo ($\lambda = 904 \text{ nm}$), denominado de diodos Lasers semicondutores, sendo constituído de Arsenieto de Gálio (As-Ga). Esses lasers diodos geralmente atuam na forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne opera somente em modo contínuo.

Trabalhos pioneiros realizados no Leste Europeu e Rússia sugeriram que o tratamento a laser infravermelho (IR) era relativamente mais eficiente para a indução de cicatrização de feridas cutâneas (BRAVERMAN, 1989). REDDY (2003) comparou o laser visível He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) e o As-Ga infravermelho contínuo ($\lambda = 904 \text{ nm}$) na cicatrização de feridas diabéticas, e verificou que as diferenças nos efeitos estimulatórios entre lasers He-Ne e As-Ga dependiam da resposta fotoquímica das células em cada comprimento de onda e propriedades de coerência da radiação eletromagnética. Por outro lado, os lasers atuando na faixa espectral vermelha apresentam resultados eficientes no tratamento de feridas, principalmente no estímulo de atividades angiogênicas (SCHINDL, 2003; KIPSHIDZE *et al.*, 2001; AMIR *et al.*, 2000), contribuindo assim para a maior atividade na cicatrização de úlceras na pele devido a um maior fluxo sanguíneo local.

2.4. Princípios do Sistema Operacional Laser

Quando um fóton ou partícula energética de luz é direcionado em um átomo, ele pode ser absorvido, refletido ou transmitido. Se a partícula é refletida ou transmitida, não há mudança na energia luminosa. Entretanto, se o fóton é absorvido, a energia elétrica no orbital é aumentada. Um ou mais elétrons passam para uma mudança na posição, partindo de uma órbita interna para uma órbita periférica. (SNYDER-MACKLER e SEITZ, 1990). No momento em que um elétron se acha no estado de energia mais alto, diz-se que o átomo está excitado e esse estado permanece por um

período muito curto, caracteristicamente cerca de 10^{-8} s, e ao retornar a sua órbita original, elimina seu excesso de energia na forma de um fóton de luz, exatamente com as mesmas características do fóton incidente. Essa emissão estimulada de radiação, em pouco tempo, ganha proporções relevantes na ativação atômica, produzindo uma constante emissão de laser. (LOW, 2001; BAXTER, 1998).

Para produzir o feixe luminoso, as fontes de luz lasers dependem de alguns componentes essenciais. Um deles é uma fonte de energia que permita o “bombeamento” do meio ativo para o estímulo inicial da excitação atômica, possibilitando a seqüência na produção da emissão estimulada de radiação. (PASCU, 2000). Esta energia pode ser entregue de vários modos: energia elétrica (como no caso de lasers de diodo ou de gases), energia luminosa produzida por lâmpadas flash (no caso de lasers da família YAG) ou por outro laser (como os lasers com meio ativo líquidos que normalmente são bombeados por lasers de argônio). O meio ativo é constituído por materiais (sólido, gasoso, líquido, semi-sólidos, semicondutores e excímeros) que podem produzir a radiação laser (GENOVESE, 2000). Entre os materiais, pode-se destacar dois meios utilizados nas irradiações de LLLT, sendo a mistura gasosa de hélio e neônio (He-Ne), ou o meio ativo mais utilizado na atualidade que é o semicondutor diodo de arsenieto de gálio (As-Ga), arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs), ou arsenieto de gálio, índio e fósforo (AlGaInP) que tipicamente produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950 nm (BAXTER, 1994). Outro componente fundamental para a produção da radiação é a cavidade ou câmara ressonante óptica (Figura 3), que é constituída por um tubo reto contendo um meio ativo. Em cada extremidade do tubo, existem espelhos, sendo um deles totalmente refletivo e o outro uma saída de luz semi-refletiva. Quando os elétrons são estimulados por uma fonte de energia externa numa rápida taxa, fótons resultantes são alinhados em uma câmara refletora. Quando eles alcançam o espelho semitransparente, os fótons são refletidos de volta ao espelho refletor. O constante retorno e a forte reflexão entre os espelhos promovem uma amplificação da luz. Com a continuidade do processo, mais e mais fótons são estimulados até que a câmara não pode conter o nível energético e libera a emissão da luz laser.

FIGURA 4. – Cavidade óptica ou Cavidade ressonância.

2.5. Propriedades e Comportamento da Radiação Laser

A emissão de luz laser possui as características gerais de toda luz: pode ser refletida, refratada e absorvida ao interagir com a matéria. As propriedades que tornam a luz laser diferente das fontes de luz incandescente e fluorescente são a monocromaticidade, coerência e a colimação.

O fenômeno de promover fótons, com cores iguais e todos com o mesmo comprimento de onda, caracteriza a monocromaticidade da luz laser. A monocromaticidade é a propriedade da radiação laser que descreve a distribuição espectral correlacionada com a intensidade desta. (PASCU, 2000). Outras fontes geradoras de luz são compostas por uma grande variedade de comprimentos de onda, o que resulta na visualização da cor branca (BAXTER, 1994). O laser é uma das poucas fontes de luz que produzem um comprimento de onda específico (SNYDER-MACKLER E SIETZ, 1990).

A luz Laser possui a propriedade de unidirecionalidade, ou seja, o feixe de luz ou fótons produzidos pelo equipamento laser são todos paralelos, com discreta divergência angular, demonstrando que o feixe de fótons é colimado. BAXTER (1998) e GENOVESE (2000) afirmam que a luz colimada permite concentrar o feixe de luz em um ponto focal, mantendo a potência óptica ao longo de distâncias consideráveis e uma maior concentração de energia ou brilho.

A coerência da luz denota uma das propriedades específicas da radiação laser, que está intimamente relacionada com os mecanismos de emissão estimulada. Segundo

CHARMAN (1990), os lasers são um exemplo típico de excitação coerente acumulativa de energia eletrônica oscilante bombardeada, que é liberada na emissão das ondas coerentes. A coerência é descrita por meio da capacidade de determinação da interferência das cristas das ondas eletromagnéticas quando interagem com uma segunda emissão laser no mesmo comprimento de onda. A emissão estimulada gera fótons coerentes cujas energias se somam e viajam na mesma direção no espaço, denominando-se de coerência espacial. E quando as depressões e picos das ondas de luz emitida se encaixam perfeitamente no tempo, denomina-se coerência temporal (Figura 4). Segundo GENOVESE (2000), as cristas e as cavidades estão em fases, em que a coerência tem sua influência na amplitude e na potência.

FIGURA.5 – A luz coerente

FONTE: SNYDER-MACKLER, L e SEITZ, L. (1990) Thermal Agents in Rehabilitaiton. Philadelphia. Ed. Davis Company

2.6. O LED Terapêutico de Baixa Intensidade

Desde o advento do diodo nos anos 70, a emissão de luz ganhou dimensões na aplicabilidade em vários setores. O termo “LED” é um acrônimo de Light Emitter Diode (Diodo Emissor de Luz), que, como o próprio nome diz, é um diodo, baseado em junções p-n (p – positivo; n – negativo), que, quando energizado, emite luz. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado “eletroluminescência”. Geralmente, os LEDs são utilizados em substituição às lâmpadas

de sinalização ou lâmpadas piloto nos painéis de aparelhos e instrumentos variados. Os LEDs têm grandes vantagens sobre as lâmpadas incandescentes convencionais. Eles não possuem filamento que queimam facilmente, proporcionando um tempo de vida útil de 100.000 ou mais horas, são atômicos e possuem menor consumo energético. O LED é quase um laser, diferenciando-se na formação da luz, pois, quando o diodo de um laser está contido dentro de uma cavidade ressonância, promove fótons que são amplificados pela emissão estimulada da luz e proporciona feixes de luz coerente e colimado. Por outro lado, no LEDT (LED Terapêutico) não existe esta cavidade óptica, desprovendo a luz de coerência e colimação, mas produz uma banda de espectro eletromagnético próxima do laser.

Desde a introdução da fotoestimulação na medicina, a efetividade de uma variedade de fonte luz tem sido avaliada. Na última década, alguns pesquisadores demonstram a aplicabilidade do LED terapêutico em estudos experimentais e clínicos, ainda que poucos, demonstrando a eficiência fotobiomoduladora celular semelhante ao LLLT (VINK, 2003; YOUNG *et al.*, 1989). Diante das evidências demonstradas pela NASA na aplicação do LED, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou testes clínicos da aplicação de LEDs na cicatrização de feridas em humanos, devido ao insignificante risco de lesões na pele (WHELAN, 2001).

2.7. Princípios do Sistema Operacional LED

Diodos são tipos simples de dispositivo semicondutor. Semicondutor é um material com uma habilidade variada para administrar corrente elétrica. Muitos semicondutores são feitos de um condutor pobre que teve impurezas (átomos de outros materiais) adicionadas. O processo de adicionar impurezas é chamado de dopagem.

O LED é um dispositivo optoeletrônico, que é formado por uma junção p-n (p é empobrecida em elétrons, e n é enriquecida com elétrons) que, ao ser diretamente polarizada, faz com que os elétrons cruzem a barreira de potencial e se recombinem com as lacunas. Ao se recombinarem, ocorre a emissão de energia na forma de luz. Quando atravessados por corrente elétrica, os LEDs dopados, geralmente com fosfeto de arsenieto de gálio ou fosfeto de gálio, emitem luz visível vermelha ou amarela, de acordo com a concentração de fósforo (Figura 5). Quando dopado com arsenieto de

gálio, o LED emite radiações infravermelhas. Utilizando-se fosfeto de gálio dopado com nitrogênio, a luz emitida pode ser verde ou amarela.

O fenômeno de excitação atômica do diodo para a produção da luz segue a teoria proposta por Einstein em 1917, mas a promoção física da luz de um LED difere da luz Laser devido à inexistência de uma cavidade óptica (KARU, 2003). Devido ao fato de a luz ser ausente de colimação, haverá a necessidade de um meio de colimação da luz, sendo a luz convenientemente direcionada por ponteiros de acrílico.

FIGURA. 6: Diodo Emissor de Luz

FONTE: HOW STUFF WORKS (2002). <http://www.electronics.howstuffworks.com/led2.htm>. Acesso em: 12/12/2004.

2.8. Propriedades e Comportamento da Radiação LED

A luz emitida pelo LED é ausente de coerência e colimação (BAGNATO, 2002). A coerência da luz deve ser distinguida por dois aspectos: seu efeito físico e a interação desta luz com as moléculas ou tecidos. Sob condições fisiológicas a absorção da luz de baixa intensidade pelo sistema biológico é de natureza puramente não coerente, devido à taxa de excitação da decomposição da coerência em níveis de elevada magnitude em relação à taxa de fotoexcitação. O tempo de decomposição da coerência de fotoexcitação determina a interação com moléculas adjacentes, sobre condições menores do que 10^{-12} segundos. O tempo médio de excitação depende da intensidade da luz, sendo que, em 1 mW/cm^2 , o tempo é em torno de 1 segundo. Isso determina que a

coerência é retida ao longo dos primeiros extratos da pele, antes que produza a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras especializadas (melanina, porfírina, citocromo c oxidase e hemoglobina) (KARU, 2003). Por outro lado, alguns estudos afirmam que a coerência é de fundamental importância para a promoção dos efeitos terapêuticos proporcionados pela luz (PÖNTINEN *et al.*, 1996; BIHARI *et al.*, 1989).

O espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo em relação ao do Laser. O Laser é caracterizado por uma maior concentração da fluência em uma pequena faixa espectral ($660 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$). Já no LED, a densidade de energia está distribuída em uma banda eletromagnética maior ($635 \pm 35 \text{ nm}$), podendo interagir com um maior grupo de fotorreceptores específicos. Apesar dessa propriedade diferenciar as luzes terapêuticas, há similar concentração de energia na área de ação de ambas, porém com distribuição diferenciada (Figura 6). Sendo assim, a densidade de energia total difere nas luzes incoerentes e coerentes, visto que existe uma menor energia por faixa espectral para o LED em relação ao Laser. Mesmo diante dessas diferenças na distribuição da energia, pode-se analisar que há uma ampla janela biológica de absorção da luz nos tecidos biológicos diante da aplicação dessas luzes terapêuticas, permitindo a ação biomoduladora nos respectivos receptores de luz. Na figura 7, verifica-se que as células sanguíneas possuem uma ampla absorção da luz, determinando picos em algumas faixas de comprimentos de onda, garantindo uma satisfatória extensão da fotomodulação na janela biológica.

Figura 7. Distribuição da energia do Laser e LED por banda espectral.

Figura 8. Absorção da luz nas células sanguíneas.

Fonte: DaCosta, R. S, et al (2003). Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 78(4): 384-392.

2.9. Mecanismos de Ação Fotobiofísico Universal

Do ponto de vista eletromagnético, os sistemas de vida, como as moléculas, macromoléculas ou células vivas, são geralmente administrados pela interação eletromagnética das partículas chamadas fótons. Um expressivo exemplo de regulação da função de vários comprimentos de ondas pode ser evidenciado na botânica, em que fótons de 660 nm são capazes de estimular, ou os fótons de 730 nm de interromper o crescimento das plantas. Células fagocitárias humanas são naturalmente emissoras de luz, sendo as moléculas de oxigênio simples fontes desta luz emitida em 480, 570, 633, 760, 1060 e 1270 nm (KLIMA, 2000). Tecnologias luminosas de baixa intensidade e monocromáticas exercem elevada ação biomoduladora sobre as células irradiadas. As interações da luz com o tecido vivo dependem da penetração, absorção e espalhamento da luz no tecido.

Segundo PÖNTINEN (2000), LOW e REED (2001), a profundidade de penetração é relacionada ao comprimento de onda da radiação, sendo de 0,5 a 2 mm para a luz vermelha (635 - 670 nm) e de 2 a 4 mm para a luz infravermelha (820 - 904 nm). MELO e colaboradores (2001), por meio de seus estudos, verificaram que a aplicação a laser com 630 nm de comprimento de onda demonstrava uma elevada

penetração da luz no tecido adiposo da parede abdominal de ratos Wistar (17mm) e discreta penetração nos músculos da parede abdominal (4,33 mm). No mesmo estudo, quando utilizado um comprimento de onda de 670 nm na parede abdominal de rato vivo, foi notada uma penetração de 6,36 mm (Figura 6). PÖNTINEN (2000) e BASFORD (1995) afirmam que a biomodulação pode ser conquistada a seis profundidades de penetração a partir de uma fluência de 4 J/cm^2 ao nível da pele, permitindo-se obter uma profundidade de 1,2 cm para a radiação com penetração de 2 mm. Nas grandes articulações e músculos, uma fluência inicial de 100 a 300 J/cm^2 , no tecido superficial é atenuada a 20 J/cm^2 em seis profundidade de penetração e com uma fluência efetiva pode ser mantida a uma profundidade de 5 a 10 cm.

FIGURA 9: Profundidade de penetração dos comprimentos de onda na pele.

FONTE: SIMUNOVIC, Z; TROBONJACA, T. (2000) Lasers in Medicine and Dentistry – Basic Science and up-to-date Clinical Application of Low Energy – Level Laser Therapy.

Quando a fototerapia é focada sobre a epiderme, a quantidade de energia absorvida é proporcional à qualidade do tecido. Em tecido com elevado índice de melanina, a energia luminosa é altamente absorvida (SNYDER-MACKLER e SEITZ, 1990). Nestas circunstâncias, as janelas de potência óptica (mW) e o limiar de densidade energética (J/cm^2) influenciarão a profundidade de penetração devido à absorção da luz por estes tecidos hiperpigmentados (SOMMER *et al.*, 2001). TRELLES e MAYAYO (1992) demonstraram a eficácia progressiva da degranulação de

mastócitos com o aumento da potência, sendo os ratos tratados com potências de 4 mW e 50 mW e fluências semelhantes.

Uma reação fotobiológica envolve a absorção de um específico comprimento de onda de luz por moléculas especializadas fotorreceptoras. Diante da luz absorvida com determinado comprimento de onda, essas moléculas assumem um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários que desencadeiam efeitos biológicos em determinadas circunstâncias (KARU, 1999). STADLER (2000) sugere que a hemoglobina pode tomar parte na absorção da energia luminosa durante fotoirradiação nos comprimentos de onda entre 600 a 700 nm. A fotoexcitação de certos cromóforos na molécula citocromo c oxidase (semelhante a Cu_A e Cu_B ou hemes a e a_3) participa de uma estrutura-chave na regulação das vias metabólicas, sendo a cadeia de redox um exemplo típico de estrutura-chave. A influência no estado de redox desses centros promove uma taxa acentuada de fluxo de elétrons na molécula (hipótese da alteração das propriedades de redox). Outra hipótese formula que quantas de espectro de luz vermelho fotoabsorvidos por porfirinas e flavoproteínas são responsáveis pela geração de oxigênios simples (1O_2) e, portanto, estimulam a síntese de RNA e DNA. Sob condições fisiológicas, a atividade do citocromo c oxidase é também regulada pelo óxido nítrico (NO), uma vez que essa regulação ocorre via de inibição da respiração mitocondrial. A hipótese do NO sugere que a ativação fotônica do fluxo de elétrons na molécula de citocromo c oxidase pode reverter à inibição parcial do centro catalítico por meio do NO, aumentando deste modo o O_2 . (KARU, 2003). KARU (1993) sugere a hipótese do ânion superóxido, visto que, através da irradiação de laser diodo, ocorre uma ativação do fluxo de elétron na cadeia respiratória de células irradiadas, podendo contribuir para a produção de ânion superóxido. Todas as hipóteses citadas anteriormente estão relacionadas com as reações primárias após a absorção de luz na mitocôndria. A fotoexcitação induz mudanças no citocromo c oxidase e nos componentes flavínicos da cadeia (NADH-dihidrogenase). Esse evento pode proporcionar outras mudanças de redox e modulação de reações bioquímicas na cadeia de amplificação e transdução do sinal fotônico ou cascata de sinalização celular, definindo o mecanismo de reações secundárias em nível celular (KARU, 1999). KARU (2003) relata que, diante do estado de redox intracelular, ocorre um estímulo da modulação celular via fatores transcritivos como o fator nuclear kappa B (NF-Kb) e proteína ativador (AP)-1, além de fosfolipase A_2 .

LOW e REED (2001) afirmam que todas as células possuem citocromos (absorção de luz em vários espectros de ação), permitindo que a luz vermelha estimule todas elas. Como consequência, DANHOF (2000) comenta que o laser trabalha diretamente na permeabilidade da membrana celular, facilitando a mobilidade iônica (cálcio, sódio e potássio) e aumentando indiretamente a produção de ATP, uma vez que a energia liberada pela hidrólise de ATP promoverá o correto funcionamento da bomba de sódio e potássio. Sendo assim, pacientes com tecidos imunodeficientes, os quais se encontram com o potencial de membrana reduzidos, poderão ser beneficiados com a fototerapia de baixa intensidade devido à rápida despolarização que é promovida sobre a influência desses estímulos, melhorando o metabolismo celular.

O espalhamento da luz depende da qualidade do tecido e do ângulo de incidência do dispositivo emissor de irradiação de baixa intensidade. Peles oleosas e com pouca melanina (superfície lisa e polida) poderão atuar como superfícies refletoras de luz (DANHOF, 2000). Quando há um aumento do ângulo de incidência do laser sobre o tecido, existe um aumento da reflexão e conseqüentemente uma maior refração da luz transmitida no tecido. KREISLER *et al.* (2002) verificaram, por meio de aplicação de laser diodo de alta intensidade posicionado em ângulos de 10° e 90° na superfície do tecido, um menor dano aos tecidos adjacentes com a fibra posicionada a 10°. Entretanto o autor sugere que, para desenvolver potencial regenerativo, o emissor laser deve ser posicionado a 90° para promover maior absorção da energia.

2.10. Laser e LED na Reparação Tecidual

Desde o advento do laser terapêutico em 1960, a aplicação clínica no tratamento de feridas está ganhando dimensões cada vez maiores. Os pesquisadores estão sempre preocupados em quantificar as estruturas presentes nos tecidos que colaboram para a evolução da reparação da lesão por meio de análises histológicas. Atualmente com a biologia molecular e a genética, os estudiosos procuram verificar os sinais celulares que estimulam ou inibem a síntese de fatores de crescimento e síntese protéica. Além das análises teciduais e celulares, os cientistas idealizam constantemente a popularização do tratamento fotônico, visto que estudos estão sendo realizados para verificar a aplicabilidade clínica do LED terapêutico de baixa intensidade nas diversas condições patológicas.

Como todo processo de reparação é precedido de uma fase inflamatória, e esta é de fundamental importância para o sucesso da evolução de uma ferida, há uma constante busca para obter o conhecimento da influência da fototerapia nesta fase de cicatrização. HONMURA (1992) utilizou modelos inflamatórios com carragenina (um tipo de polissacarídeo extraído do molusco *Trish*) no dorso e na pata dos ratos Wistar comparando os efeitos do tratamento da droga indometacina e laser diodo de Ga-Al-As com potência de 10mW (31 J/sec/cm^2) durante sete dias consecutivos. Realizou análise da permeabilidade vascular da proteína do plasma e verificou que a irradiação laser inibe a permeabilidade vascular no estágio agudo e a formação de granuloma no estágio crônico e que a droga indometacina era superior ao laser.

Um fator importante para a rápida recuperação de uma ferida é por intermédio do estímulo do sistema linfático. O efeito antiedematoso ou o aumento de drenagem da superfície irradiada é somente evidente se ocorrer estase venoso-linfática. Esse efeito é notório em edema de síndrome varicosa, linfedema e outras situações clínicas (LONGO, 2000). ÖZKAN (2004) utilizou um laser diodo infravermelho (904 nm) pulsado em pós-operatório de tendões digital flexores de humanos, apresentando um significativo efeito positivo na redução do edema, através da mensuração do volume de água.

PESSOA (2004) administrou laser diodo pulsado (904 nm) com potência de 2,75 mW e energia de 0,33 mJ em 7 pontos nas margens da ferida e um ponto central, totalizando uma fluência de 33 J/cm^2 . Além do tratamento com laser, foi utilizado o corticoesteróide dexametasona (2 mg/Kg). A ferida, promovida com um “punch” de 8mm de diâmetro, foi avaliada histologicamente no 3º, 7º e 14º dias. Os resultados demonstraram que as feridas tratadas com corticoesteróides tinham um atraso na cicatrização, enquanto o laser acelerava o processo de cicatrização das feridas. Os animais tratados com laser combinado com esteróides apresentavam um menor infiltrado inflamatório, demonstrando uma conseqüente elevação na formação de colágeno e vasos sanguíneos. Resultados similares foram conquistados por MEDRADO (2003) com laser diodo (670nm), ajustado em 9 mW, e doses de 4 e 8 J/cm^2 . Neste experimento foi realizada análise imuno-histoquímica para miofibroblastos, verificando uma grande proliferação destas células com 4 J/cm^2 .

A ação da quimiluminescência sobre as células inflamatórias fagocitárias (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos), quando sob ação de bactérias, tumores ou corpos estranhos, é estimulada a produzir ROS como defesa antitumoral e antibacteriana. KARU (1993) desenvolveu estudo “in vitro” com esplenócitos e

verificou os efeitos estimulantes da radiação laser no aumento porcentual de neutrófilos e plasmócitos no baço, sendo estes efeitos bem conhecidos sobre condições patológicas e de envelhecimento. FUJIMAKI *et al.* (2003), por meio de cultura de neutrófilos, verificaram que o laser diodo infravermelho possuía efeitos biomoduladores, uma vez que a terapia permitia atenuar a produção de radicais livres produzidos pelos neutrófilos. STADLER (2000) demonstrou o aumento da produção de superóxido dismutase, controlando a liberação excessiva de ROS, em linfócitos retirados do sangue e tratados com o laser argônio bombeado com corante a um comprimento de onda de 660 nm, e ajustado a uma fluência de 5 J/cm². Sendo assim, o metabolismo oxidativo das células foi regulado pela formação de radicais livres mediante a interação do laser de 660 nm e a hemoglobina, servindo como um cromóforo, permitindo que o organismo intacto eliminasse os metabólicos oxidativos lesivos. Segundo KARU (1995), o oxigênio reativo em condições fisiológicas é necessário como fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa de ADP.

NUSSBAUM *et al.* (2002) utilizaram culturas de bactérias de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Stafilococcus aureus*, que foram irradiadas com comprimento de onda de 630, 660, 810 e 905 nm (0,015 W/cm²) e exposição radiante de 1 a 50 J/cm². O comprimento de onda de 630 nm com fluência de 1 J/cm² estava comumente associado com a inibição de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

A exposição radiante da luz de baixa intensidade em vários comprimentos de onda, quando aplicada a macrófagos, estimula a liberação de fatores de crescimento (YOUNG, 1989). EL SAYED e DYSON (1990) utilizaram vários comprimentos de ondas em uma única fonte de energia, e aplicados de forma individualizada. O conjunto de múltiplos comprimentos de onda era composto por 21 diodos (1 laser de 820 nm e os demais formados por LEDs de 660, 870, 880, 940 e 950 nm). Uma ferida de 1 cm² era realizada em ratos Wistar com um bisturi e, depois de tratado, o animal era sacrificado. O material era então encaminhado para solução de degranulação de mastócitos e analisado em microscopia de luz. Os resultados demonstraram que os mastócitos estimulados apresentam elevada degranulação, principalmente quando tratados com o conjunto múltiplo de diodos monocromáticos.

Células imunoinflamatórias semelhantes a macrófagos e linfócitos-T são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento que controlam a funcionalidade de outras células e regulam o processo de angiogênese e fibroplasia. AGAIBY e colaboradores (2000) trataram culturas de células endoteliais da aorta por meio do laser pulsado (5.000

Hz) com comprimento de onda de 820 nm e intensidade de 50 mW. As densidades de energia variavam de 1,2, 3,6, 6,0 a 8,4 J/cm². A máxima atividade proliferativa de células endoteliais, como indicado pelos valores de absorção, era produzida por sobrenadantes de linfócitos-T expostos à LLLT em uma densidade de energia de 1.2 e 3.4 J/cm². Com fluências de 6,0 e 8,4 J/cm², as leituras de absorção eram baixas em relação ao controle, havendo uma função inibitória.

WHELAN *et al.* (2003), utilizando um procedimento cirúrgico no subcutâneo do dorso de ratos diabéticos geneticamente induzidos, administraram duas esponjas (3 x 3 x 5 mm) e determinaram o 2º, 4º, 7º e 14º dias como data de sacrifício para coleta das amostras e análise do DNA no “microarray”. Os efeitos da expressão gênica após o tratamento a LED (670 nm) com 4 J/cm² demonstraram forte ação na cicatrização de feridas e possivelmente na modulação da dor. A transcrição de laminina e nidogem é elevada durante a fase inicial migratório-proliferativa da angiogênese, mas diminui significativamente nas fases posteriores, quando predomina a maturação dos vasos e a formação do tubo. Fatores de crescimento fibroblástico 7 e 12 mostraram-se regulados pelo LED no segundo dia de tratamento. O gene Galactina-7, que é considerado uma marca de todo subtipo de queratinócitos, era regulado em 2 dias e continuava elevando-se após o 14º dia de intervenção do LED. Os genes reguladores do cálcio, Calpactinas, eram também modulados pelo tratamento em relação ao controle.

WHELAN *et al.* (2001) analisaram bioquimicamente feridas nos dias 0, 4, 7 e 14. Os níveis de fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foram determinados utilizando-se o ELISA, após a intervenção do LED (880 nm) com fluência de 4 J/cm². Os níveis de FGF-2 apresentavam índices significativos em todos os dias de análise, principalmente no 4º dia. Entretanto, os níveis de VEGF foram semelhantes ao controle. Esse experimento demonstrou resultados eficientes no aumento da taxa de crescimento da cicatrização das feridas, quando comparada aos controles.

YAAKOBI *et al.* (2001) realizaram uma oclusão na artéria coronária de 18 ratos simulando uma lesão por reperfusão isquêmica no coração. Após o procedimento cirúrgico, iniciou-se o tratamento com laser diodo de Ga-As (804 nm e potência de 38mW e emissor de 1.5 x 3.5 mm) com fibra óptica administrada diretamente no coração através do músculo intercostal anterior. O tratamento com laser aumentou o número de vasos sanguíneos e o número de células endoteliais. O presente estudo indicou que o laser de baixa intensidade tem efeitos benéficos quando a isquemia no

miocárdio é transitória e seguida por reperfusão da lesão. O autor sugere que a elevação direta ou indireta da atividade de catalase e/ou de outras enzimas que agem como antioxidantes (superóxido dismutase) por meio do laser pode contribuir para uma redução no conteúdo superóxido nas lesões reperfundidas ou no coração isquêmico. KIM (2000) investigou a exposição de várias doses de laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm, 10 mW), verificando a ocorrência de prejuízos nas membranas celulares por intermédio do aumento de peroxidação lipídica em conjunto com a geração de radicais livres. Os resultados demonstraram que a atividade dos principais antioxidantes na pele dos ratos, como a superóxido dismutase e catalase, era dose-dependente, apresentando aumento diante da energia de 1 J e redução com 5 e 7 J.

SCHINDL (2003), por meio da cultura de células endoteliais da veia umbilical humana e irradiada com laser diodo (670nm) mediante doses de 2, 4, e 8 J/cm², verificou que ocorria uma elevada proliferação de células endoteliais tratadas com 8 J/cm² em relação aos controles. O autor sugeriu que esse crescimento estava associado com a indução de fatores de crescimento angiogênicos à exposição laser e à modulação fotodinâmica da quantidade de espécies de oxigênio reativo.

KIPSHIDZE (2001) desenvolveu cultura de células e irradiou laser He-Ne com potência de 5 mW. Entretanto somente 3,5 mW atuava através da fibra óptica de 600 microns sobre as placas de cultura. Havia exposições radiantes de 0s (0,10 J/cm²), 3 min (0,31 J/cm²); 5 min (0,52 J/cm²); 10 min; 15 min; 20 min; 30 min; 40 min e 60 min (6,3 J/cm²). A secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por células de músculo liso e fibroblastos era quantificada pela técnica de enzima imunoanalítica. A proliferação de células endoteliais era mensurada pela técnica de avaliação Alamar.Blue. VEGF e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) expressos por células cardíacas foram estudados por reação de cadeia de transcrição polimerase reversa em tempo real (RT-PCR). Os pesquisadores demonstraram com esse estudo que a irradiação do laser de baixa intensidade aumentava a produção de VEGF e TGF- β estimulando a proliferação de células endoteliais.

A atividade das células endoteliais é regulada também pela quantidade de cálcio intracelular, exercendo influência na produção de substâncias vasoativas, proliferação celular e expressão gênica (ISSHIKI *et al.* 1998). COOMBE *et al.* (2001) e ROCHKIND *et al.* (2004) demonstram, mediante a irradiação com laser de baixa intensidade, a ocorrência da elevação de cálcio intracelular.

VINCK *et al.*, (2003) estudaram a influência do LED policromático e do laser diodo infravermelho (830 nm) em culturas de fibroblastos, verificando um aumento dessas células em ambos os tratamentos. AMIR *et al.* (2000) irradiaram laser He-Ne em modelos de feridas isquêmicas de ratos Wistar, evidenciando uma elevada angiogênese, acompanhada de proliferação de fibroblastos.

CORAZZA *et al.* (2005), em um estudo piloto comparativo entre laser diodo de baixa intensidade, atuando na escala eletromagnética de 660 nm (40 mW) e 780 nm (50 mW), e LED com 630 nm (90mW) e 880 nm (50 mW) e todos ajustados a uma fluência de 5 J/cm^2 , utilizaram 40 ratos machos da raça Wistar, em que foi induzida mecanicamente uma ferida no terço médio do quadríceps do animal com um punch de 15 mm de diâmetro. Após seis horas de indução, o animal era tratado e o sacrifício ocorria no 3º, 7º, 14º e 21º dia. Os resultados indicaram uma fotomodulação da fase inflamatória de todos os grupos, diminuindo o número de células inflamatórias em relação ao controle. Ocorria também aumento do número de fibroblastos do 3º ao 7º dia e conseqüentemente uma maior deposição de colágeno, uma vez que o comprimento de onda infravermelho era mais efetivo para a fibroplasia. Foi evidenciada elevação da taxa de crescimento angiogênico com a utilização do espectro eletromagnético vermelho com as tecnologias LED e laser diodo desde o 3º dia. Esses resultados sugeriram a utilização da fotobiomodulação LED para tratamento de ulcerações cutâneas, com resultados comparáveis aos obtidos com a Laserterapia de Baixa Intensidade. Os comprimentos de onda atuavam de modo seletivo em cada estrutura nas fases de reparação tecidual, proporcionando uma regulação celular propícia para a adequada organização do tecido fibroso.

BISHT *et al.* (1999) realizaram uma incisão bilateral (2 cm) no dorso dos ratos e, imediatamente após o procedimento cirúrgico, fecharam com 3 pontos de sutura em 5 mm. Trataram com laser He-Ne (5 mW), analisando histologicamente o infiltrado leucocítico, neovascularização, proliferação fibroblástica, epitelização e formação de colágeno. Além dessa análise, foi realizado um ensaio mecânico para determinar a força de tensão do tecido. Os resultados sugeriram que o laser promovia uma epitelização antecipada, devido a um aumento da reação fibroblástica, infiltração leucocitária e angiogênese. A habilidade de a ferida resistir à ruptura contra uma força de tensão era significativamente aumentada nos animais tratados.

O aumento da força de tensão e tenacidade dos tecidos devido à maturação e maior organização das fibras de colágeno é afirmado em vários trabalhos utilizando o

espectro eletromagnético vermelho e infravermelho, na dependência das respostas fotoquímicas das células (KANA *et al.*, 1981; SURINCHAK *et al.*, 1983; BRAVERMAN *et al.*, 1989; SIMUNOVIC *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2003)

AL-WATBAN (2003) realizou ferida oval ($1,5 \text{ cm}^2$) no glúteo máximo de ratos diabéticos e não-diabéticos, com um metal aquecido a 600°C . Irradiou as feridas por meio de um LED policromático com 25 diodos, com comprimento de onda verde (510 – 543 nm), amarelo (594 – 599 nm), laranja (626 – 639 nm), vermelho (640 – 670 nm) e infravermelho (842 – 872 nm). A potência do equipamento era de 272 mW e fluências de 5, 10, 20, e 30 J/cm^2 , e o tratamento ocorria três vezes por semana. Os animais eram fotografados no momento da indução e no 7º, 14º, e 21º dias de pós-indução da lesão. Os resultados permitiram verificar que o tratamento a LED policromático utilizando doses energéticas de 5, 10, 20 e 30 J/cm^2 influenciavam a cicatrização em 6,85%, 4,93%, -4,18% e -5,42% nos ratos não-diabéticos; e 73,87%, 76,77%, 60,92% e 48,77% nos ratos diabéticos, relativos aos seus controles, respectivamente. Esse estudo demonstrou que a fototerapia LED exercia excepcional efetividade nos ratos diabéticos tratados com todas as fluências. MEDRADO *et al.* (2003) criaram uma ferida de 8 mm de diâmetro no dorso dos ratos Wistar, e trataram com um laser diodo (GaAlAs) no espectro de ação de 670 nm. A potência era de 9 mW e fluência de 4 e 8 J/cm^2 . Havia diferença estatística nas áreas das úlceras cutânea tratadas e não tratadas já nas primeiras 24 horas e, após 72 horas, ocorria grande diferença, sendo evidente a superioridade do tratamento com 4 J/cm^2 em relação a 8 J/cm^2 . As diferenças estavam presentes até o 7º dia. No 14º dia todos os animais apresentavam as feridas cicatrizadas. Resultados semelhantes foram obtidos por KANA *et al.* (1981), que irradiaram laser de He-Ne e argônio sobre feridas de 15 mm de diâmetro sobre o dorso dos animais.

AL-WATBAN e ZHANG (1997), e RIBEIRO *et al.* (2002) irradiaram com lasers de baixa intensidade e, após análise biométrica das feridas, verificaram resultados satisfatórios com o tratamento. LAGAN (2002) tratou pacientes com úlceras venosas através de uma fonte com 31 diodos (GaAlAs; 532 mW; pulso de 5 KHz), com espectro de ação variando de 660 a 950 nm, e fluência de 12 J/cm^2 . Já LAGAN *et al.* (2000) utilizaram um laser diodo contínuo de 830 nm, potência de 30 mW e fluência ajustada em 9 J/cm^2 . Nos dois trabalhos foi utilizada planimetria polar das fotografias, evidenciando resultados efetivos no tratamento.

BRAVERMAN *et al.* (1989) compararam um laser He-Ne (632,8 nm e potência de 10 mW) a um laser diodo de GaAlAs (904 nm e potência de 50 mW), mediante análise fotográfica, além de realizar ensaios mecânicos e análise histológica. Os resultados macroscópicos demonstraram uma insignificante diferença entre os grupos. Resultados semelhantes foram obtidos por SURINCHAK *et al.* (1983) no tratamento de feridas de coelhos com laser He-Ne (50 mW), e por WALKER *et al.* (2000), irradiando com laser diodo (660 nm e potência de 15 mW) sobre feridas desenvolvidas no dorso de ratos.

WEISS e ORON (1992) realizaram uma incisão parcial no músculo gastrocnêmio de ratos Charles River, que foram tratados com laser He-Ne (6 mW). A análise histológica de células mononucleadas, miotúbulos e miofibras jovens mostrou que as células mononucleadas diminuíam em fração de volume nos animais tratados em relação ao controle. Os fenômenos interessantes do estudo foram a rápida taxa de regeneração das miofibras e o volume de miotúbulos nas margens em relação ao centro da lesão.

Esses resultados justificam a eleição da terapia fotônica de baixa intensidade no auxílio da reparação de tecidos isquêmicos ou lesados por trauma mecânico, exercendo grande apoio juntamente com as demais técnicas dispostas para esse tipo de tratamento.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus Norvegicus*, *Albinus*) machos saudáveis da linhagem Wistar, com 79 dias de idade, e massa corpórea variando de 350 a 400 gramas, provenientes do Biotério da Unicamp (Cemib). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno a uma temperatura de 22°C, com fotoperíodos de 12 horas, em ambientes com exaustores e filtros na entrada e saída do ar. Foram alimentados com ração sólida e água à vontade. A gaiola possuía dimensões (46 cm x 32 cm x 16 cm) que permitia acomodar quatro animais de modo satisfatório. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Anexo).

3.2. LED Utilizado

Este equipamento possui três comprimentos de onda, no espectro eletromagnético azul, vermelho e infravermelho (Figura 9A). Devido ao fator físico de ausência da colimação da luz LED, foi utilizada uma ponteira de acrílico na extremidade da caneta para direcionar o feixe luminoso. Mesmo com a ponteira, a fonte de luz LED apresentava divergência do feixe luminoso, o qual promovia relativo espalhamento da luz (Figura 9B).

Neste experimento foi utilizado somente o comprimento de onda vermelho (630 nm).

Um sistema emissor à base de LEDs foi montado especificamente para este trabalho, com as seguintes características:

- Alimentação = 110 V ~ / 50 – 60 Hz;

- Comprimentos de onda da luz = 430 nm; 630 nm; 880 nm;
- Potência óptica (saída da ponteira) = 50 mW (430 nm); 90 mW (635 nm); 50 mW (880 nm);
- Área do feixe de saída = 0,085 cm² (Figura 9C);
- Irradiância (utilizando a ponteira de acrílico) = 588 mW/cm² (430 nm); 1058 mW/cm² (635 nm); 588 mW/cm² (880 nm);
- Temporizador ajustável na caneta = 20, 40 e 60 segundos.

FIGURA 10: A) LED Terapêutico; B) Feixe luminoso do LED; C) Diâmetro do feixe luminoso LED

3.3 . Laser Utilizado

A outra fonte de luz utilizada neste estudo foi o Twin Laser, da marca MM-Optics[®] (Figura 10A). Esse equipamento possui dois comprimentos de onda, no espectro eletromagnético vermelho e infravermelho. A fonte de luz Laser é convergente em relação ao LED (Figura 10B).

Foi utilizado somente o comprimento de onda vermelho.

No início e no final do procedimento experimental, as potências de emissão das fontes de luz LED e Laser foram aferidas no Grupo de Óptica do Instituto de Física da USP – São Carlos, por meio de um equipamento Laser Power / Energy Monitor calibrado pelo NIST (National Institute of Standards and Technology) para a confirmação das doses de energias investigadas.

A tecnologia Twin Laser, da marca MM–Optics® adotada para este estudo, opera com os seguintes parâmetros:

- Alimentação = 127 - 220 V ~ / 50 – 60 Hz;
- Comprimentos de onda da luz = 660 nm e 780 nm;
- Potência óptica útil (saída da ponteira) = 40 mW (660 nm); 70 mW (780 nm);
- Área do feixe de saída = 0,04 cm² (Figura 10C);
- Irradiância Máxima = 1000 mW/cm² (660 nm); 1750 mW/cm² (780 nm);
- Temporizador ajustável.

FIGURA 11: A) Laser Terapêutico; B) Feixe de luz do Laser; C) Diâmetro do feixe de luz do Laser

3.4. Fototerapia

Os 120 animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, diferenciados de acordo com o experimento realizado, sendo alocados 24 ratos por grupo. O estudo foi subdividido em 4 dias distintos (3, 7, 14 e 21 dias), visto que essas etapas foram adequadas para analisar a contração e a angiogênese nas fases de cicatrização (Figura 12). Esses mesmos períodos já foram adotados por outros autores (CARVALHO *et al.* 2001; WHELAN *et al.* 2001; WALKER *et al.* 2000; BISHT *et al.* 1999; BRAVERMAN *et al.* 1989). Cada subgrupo possuía oito animais, e, conforme preconizavam YU *et al.* (1997), o tratamento foi iniciado somente 6 horas após a

A densidade de energia foi ajustada adequadamente para exercer fator comparativo. Seguindo os modelos de aplicação pontual de contatos sugeridos por MEDRADO *et al.* (2003) e YU *et al.* (1997), foram desenvolvidas nesta pesquisa aplicações semelhantes para administrar uniformemente as densidades de energia na área almejada de tratamento. As fluências foram revisadas e discutidas em várias pesquisas (REEDY *et al.*, 2003, MEDRADO *et al.*, 2003., RIBEIRO *et al.*, 2002., REEDY *et al.*, 2000., KANA *et al.*, 1981). Sendo assim, para analisar comparativamente a efetividade do tratamento com as fontes de luz e as doses de energia, foram irradiado fluência de 5 J/cm² segundo sugeriu VACCA *et al.* (1993) e YU *et al.* (1997) e uma fluência superior de 20 J/cm² segundo propôs AL-WATBAN *et al.* (1999); e AL-WATBAN *et al.* (1997). O comprimento de onda vermelho foi eleito devido aos resultados sugeridos por AMIR *et al.* (2000) e CORAZZA *et al.* (2005). O tempo de aplicação foi dividido em sete pontos distintos na área lesionada, sendo seis pontos nas margens e um central (Figura 13). O método de aplicação da caneta a 90° de incidência sobre a pele foi adotado para evitar dispersão da energia enviada para o tecido, segundo propõem LOW e REED (2001). Os sistemas emissores do Laser quanto do LED foram envoltos por um filme de PVC para evitar a contaminação dos animais. Os ratos foram posicionados abaixo da mão, evitando a sua movimentação durante todo o tempo de tratamento (Figura 14).

FIGURA 13. Ilustração da área irradiada com os tratamentos fotônicos

FIGURA 14. Tratamento fotônico dos animais

3.5. Indução das Feridas Cutâneas

Em uma primeira etapa, foram verificadas as massas corporais dos ratos, que variavam de 350 a 400 gramas. Depois de identificada a massa corporal, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular do anestésico veterinário de cloridrato de ketamina (Vetanarcol® - 50ml / 2.500 mg - Laboratório König), na dosagem de 47,5 mg/kg, associado ao sedativo, analgésico e relaxante muscular de cloridrato de xilazina (Coopazine® - 10 ml / 200 mg), na dosagem de 12 mg/kg. MASSONE (1994) sugere aplicar anestesia na proporção de 0,2 ml de ketamina para cada 100 g de massa corporal do rato, e para o sedativo/analgésico e relaxante muscular xilazina indica uma dose de 0,1 ml da droga para cada 100 g de massa corporal do animal. Para inoculação das drogas, foi utilizada uma seringa de 1 ml, graduada em 100 unidades, e dividida de 10 em 10 unidades.

Com os animais previamente anestesiados, realizava-se a tricotomia manual da coxa do animal. Foram realizadas feridas circulares com um “punch” de 15 mm de diâmetro, aprofundando 5 mm no terço médio do músculo quadríceps esquerdo (Figura 11). A padronização da área foi determinada a partir de dados dos estudos de CORAZZA *et al.* (2005); AL-WATBAN e ANDRES (2003); MEDRADO *et al.* (2003); CARVALHO *et al.* (2001); KANA *et al.* (1981).

FIGURA 15: Indução mecânica da ferida

3.6. Sacrifício dos Animais

O sacrifício dos animais foi realizado no 3°, 7°, 14° e 21° dias, por meio da inoculação excessiva do anestésico ketamina. Para garantir uma amostra satisfatória do tecido epitelial da pele, foi removida a coxa esquerda nas proximidades da ferida do animal. Em seguida, o tecido foi lavado com solução salina a 0,9%, e fixado em solução tamponada de formol a 10% para fixação do material.

3.7. Análise Macroscópica

Após o sacrifício, antes da remoção da coxa esquerda, os animais foram fotografados a uma distância padrão de 25 cm da objetiva da câmara fotográfica digital Sony Coopix FD470. Uma régua graduada era posicionada junto à lesão para padronizar a contração da ferida, auxiliando o software de planimetria no cálculo da área da ferida. O software de planimetria, denominado de “Programa Área”, foi desenvolvido pelo Laboratório de Instrumentação em Microeletrônica da Escola de Engenharia de São Carlos – USP. As fotos digitais foram anexadas ao computador Celerom AMD-Duron (1.800 MHz) e processadas no software em questão. As feridas foram fotografadas no início da incisão e no momento do sacrifício. A contração da ferida foi avaliada porcentualmente pela fórmula proposta por AL-WATBAN (2003) e YU (1997):

$$\text{Contração Relativa da Ferida (\%)} = \frac{(\text{Área Lesada Inicial} - \text{Área Contraída})}{\text{Área Lesada Inicial}} \times 100$$

3.8. Histomorfometria

Após uma fixação mínima de 24 horas, as amostras dos tecidos foram cortadas nas proximidades da área lesada e acondicionados em cassette. Um equipamento histotécnico Leica TP 1020[®] foi utilizado para a preparação das amostras. Esse aparelho possui várias estações que realizam a passagem automática das amostras em um tempo pré-programado na máquina. Inicialmente, as peças dos fragmentos permaneciam por 5 minutos em água, seguidas de uma troca de recipiente com água por 60 minutos. Na seqüência, as amostras foram desidratadas em álcool 70 por 90 minutos, seguidos de mais três recipientes diferentes de álcool absoluto, durante 90 minutos cada um. Após os banhos de desidratação, os tecidos permaneciam em álcool/xilol durante 90 minutos, e na seqüência em três diferentes recipientes contendo xilóis, permanecendo 90 minutos em cada um deles. Nos dois últimos recipientes com parafina a 60°C, os tecidos permaneceram por 90 minutos em cada frasco. Após completar essa seqüência, as amostras foram emblocadas em paraplast, cortadas com 5 µm de espessura no micrótomo, coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) e secadas em estufa.

A histomorfometria foi realizada em microscópio de luz Axiolab (Carl Zeiss), através da ocular Kpl 10X com retículo de integração II Zeiss de 100 pontos de intersecção, objetiva de 40X. A imagem foi capturada por uma câmara Sony digital CCD-IRIS/RGB e avaliada no programa de análise computadorizada de imagens KS 400[®] Karl Zeiss (Alemanha).

Geralmente, uma estrutura interna de um órgão pode ser investigada somente após a destruição do tecido. Nas técnicas histológicas, após a fixação e coloração do tecido, a integridade do tecido é preservada em duas das três dimensões espaciais, enquanto a terceira dimensão é sacrificada pelo benefício da resolução. Se a espessura da secção é muito fina em relação ao tamanho da estrutura investigada, isso pode ser ignorado, em que se pode considerar a secção, que na realidade é uma fatia do tecido com uma imagem bidimensional da estrutura interna do tecido. Como não se pode resgatar a terceira dimensão, WEIBEL (1966), por meio do princípio fundamental da estereologia estabelecido por Delesse em 1846, aplicou à histologia o cálculo da fração volumétrica ou densidade de volume de uma estrutura celular. Esse método de planimetria das estruturas teciduais ou celulares estima a mensuração da fração da área de uma secção aleatória ocupada por transecções dos pontos, ou seja, quando aplicada à contagem dos pontos de um retículo analógico ou digital sobrepostos nas estruturas

analisadas, podem-se transpor os resultados de um plano bidimensional para um tridimensional mediante cálculos específicos (Figura 14). No presente estudo, a intersecção dos pontos foi obtida por meio de um retículo digital do programa KS 400®, que apresentava um número total de 320 intersecções (pontos) em uma área de $507281.32 \mu\text{m}^2$.

A fração de volume ou densidade volumétrica relativa dos vasos sanguíneos foi calculada pela fórmula $V_{Vn} = P_n / P_T$, em que:

V_{Vn} = densidade de volume ou fração volumétrica da área analisada;

P_n = soma do número de pontos coincidentes sobre os vasos sanguíneos;

P_T = número total de pontos do retículo.

Para efetivar o resultado da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos, o estudo foi avaliado em três campos histológicos (as duas margens e o centro da ferida).

FIGURA 16. Densidade de volume no retículo sobre o corte histológico.

FONTE: WEIBEL, E. R., et al (1966). Practical Stereological Methods for Morphometric Cytology. The Journal of Cell Biology.

3.9. Análise Estatística

Para verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA no pacote SAS (Statistical Analysis System). Utilizou-se o Teste de Tukey para analisar as diferenças entre as médias dos tratamentos. A avaliação da significância estatística da diferença na densidade de volume dos vasos sanguíneos nas margens e no centro da lesão foi realizada pelo teste-t. Em ambos os casos, foram definidos valor de $p < 0,05$ como determinante de significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da Contração da Ferida por Planimetria Computadorizada

O estudo da contração das feridas foi aplicado em todos os 120 animais, sem ocorrer a perda por óbito ou qualquer outro motivo que limitasse a evolução da pesquisa.

Por meio da análise de variância, não existiram evidências que rejeitassem a hipótese de nulidade para os cinco grupos avaliados em todos os dias de sacrifício. Ou seja, isso significa que não ocorreu diferença entre as médias dos tratamentos fototerapêuticos a Laser e a LED em relação ao grupo CONTROLE na redução da área lesada no 3º, 7º, 14º e 21º dias (Tabela 1). Os resultados evidenciaram que os grupos tratados com as fototerapias a 5 e 20 J/cm² em relação ao controle não apresentaram diferença estatística significativa na análise de variância, e do mesmo modo no teste de Tukey (Tabela 1).

Nos primeiros três dias do estudo, ocorria uma tendência de maior efetividade na redução da área da ferida, principalmente com as tecnologias fototerapêuticas ajustadas a 5 J/cm² (Figura 17). Os grupos Laser e LED ajustados com densidade de energia a 5 J/cm² demonstraram uma diferença respectiva de 7,8 e 4,8 % em relação ao grupo CONTROLE.

No 7º dia o grupo Laser irradiado com 20 J/cm² apresentou uma discreta tendência na redução da área em relação ao controle, com uma diferença porcentual de 7,35%. Os grupos Laser e LED ajustados com 5 J/cm³ demonstraram uma diferença respectiva de 7,8 e 4,8 % em relação ao grupo CONTROLE (Tabela 1).

No 14º dia, o tecido cicatricial estava por se formar, visto que a média porcentual de contração da ferida variava de 92,6 a 97,9 %. O teste de Tukey verifica que não existia diferença significativa entre as médias dos tratados em relação ao

controle (Tabela 1). Entretanto os grupos Lasers apresentaram uma discreta tendência positiva em relação aos grupos LEDs e CONTROLE (Figura 17).

No 21º dia de evolução na reparação tecidual, os animais de todos os grupos apresentaram uma total epiteliação do tecido lesado (Tabela 1). Partindo desse princípio, não ocorreu a necessidade de aplicação do teste estatístico, sendo adotado o percentual de 100% de redução da área lesada (Figura 17).

Tabela 1. Contração relativa da ferida ao longo do experimento, em percentagem, na média das medidas, mensurada pelo Programa Área.

Grupos	3º dia	7º dia	14º dia	21º dia
LASER - 5 J/cm ²	63,11 ± 5,55	74,67 ± 4,84	97,45 ± 1,24	100,00
LED - 5 J/cm ²	60,18 ± 8,50	73,15 ± 6,48	92,63 ± 1,68	100,00
LASER - 20 J/cm ²	54,49 ± 7,78	77,20 ± 5,78	97,98 ± 6,14	100,00
LED - 20 J/cm ²	54,02 ± 13,61	73,91 ± 14,25	93,70 ± 6,85	100,00
CONTROLE	55,30 ± 11,46	69,85 ± 4,84	93,56 ± 10,49	100,00
*dsm	16,63	13,38	10,63	0,00

*Diferença significante mínima. Não ocorreu diferença estatística significante entre os grupos

FIGURA 17. Média percentual da contração das feridas ao longo dos dias (3, 7, 14 e 21 dias). Os grupos LED5 e LASER5, utilizaram uma fluência de 5 J/cm², e os grupos LASER20 e LED20 utilizaram uma fluência de 20 J/cm². CONTROL foi o grupo ausente de tratamento.

4.2. Histomorfometria da Angiogênese

Por intermédio da análise de variância, rejeita-se a hipótese de nulidade, tanto para o efeito do tratamento ao terceiro dia quanto para os demais dias de sacrifício. Isso significa que há pelo menos uma média de densidade de volume de vasos sanguíneos que difere dos demais grupos analisados.

No 3º, 7º e 14º dias, o teste de Tukey confirmou que as médias de densidade volumétrica dos vasos sanguíneos dos grupos tratados com Laser e LED ajustados a 5 J/cm², além do Laser e LED ajustados a 20 J/cm², são estatisticamente diferentes da média do CONTROLE. Mas no 21º dia de tratamento, os animais do grupo Laser irradiados com fluência de 20 J/cm² apresentaram semelhança estatística próxima do controle (Tabela 2).

A resposta de vascularização na pele em apenas três dias de irradiação fotônica foi elevada, sendo um fator determinante na seqüência de estímulos para a atividade angiogênica (Figura 18). Entretanto os grupos tratados com terapia fotônica a 5 J/cm² demonstraram uma tendência de maior efetividade em relação aos tratados com 20 J/cm², mas sem expressão estatística nesta resposta biológica (Figuras 19 e 20). A taxa de crescimento dos vasos sanguíneos foi para os grupos tratados com Laser e LED a 5 J/cm² de $3.03 \cdot 10^{-3}$ e $1.1 \cdot 10^{-3}$ densidade de volume por dia respectivamente (Figura 21).

Tabela 2. Teste de Tukey para média de densidade volumétrica dos vasos sanguíneos.

Grupo	3º dia	7º dia	14º dia	21º dia
LASER – 5 J/cm ²	0,142 ± 0,04 ^A	0,150 ± 0,05 ^A	0,186 ± 0,03 ^{AB}	0,313 ± 0,07 ^A
LED – 5 J/cm ²	0,138 ± 0,06 ^A	0,158 ± 0,05 ^A	0,191 ± 0,03 ^A	0,238 ± 0,07 ^{AB}
LED – 20 J/cm ²	0,108 ± 0,02 ^A	0,177 ± 0,01 ^A	0,170 ± 0,03 ^{AB}	0,197 ± 0,07 ^B
LASER – 20 J/cm ²	0,104 ± 0,021 ^A	0,136 ± 0,04 ^A	0,139 ± 0,02 ^B	0,159 ± 0,05 ^{BC}
CONTROLE	0,035 ± 0,005 ^B	0,040 ± 0,01 ^B	0,072 ± 0,02 ^C	0,066 ± 0,02 ^C
Dsm*	0,065	0,068	0,0519	0,1091

* Diferença significativa mínima. Os grupos comparados com letras semelhantes possuem significância estatística

FIGURA 18. Média da Densidade de Volume dos Vasos Sangüíneos em relação aos grupos analisados no experimento ao longo dos dias (3, 7, 14, e 21 dias). Os grupos LED5 e LASER5, utilizaram uma fluência de 5 J/cm², e os grupos LASER20 e LED20 utilizaram uma fluência de 20 J/cm². CONTROLE foi o grupo ausente de tratamento.

FIGURA 19. Taxa de crescimento da densidade de volume dos vasos sangüíneos em função dos dias de análise dos grupos LED com fluência de 5 J/cm² (LED5); LED com fluência de 20 J/cm² (LED20) e CONTROLE (ausente de tratamento).

O 7º dia de análise após a intervenção fototerapêutica demonstrava uma discreta taxa de crescimento vascular em relação ao 3º dia. Entretanto os animais do grupo LED irradiados com fluência de 20 J/cm² sugeriram uma maior tendência para a neoformação de vasos sanguíneos com uma diferença da densidade volumétrica de 0,137 do grupo CONTROLE (Figura 18). Além disso, ocorreu um aumento da densidade de volume dos vasos sanguíneos de 0,0695 do 3º ao 7º dia, mas todos os grupos tratados permaneciam com similaridade estatísticas na atividade angiogênica ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

No 14º dia a semelhança significativa dos animais tratados com LED e Laser a 5 J/cm² e LED a 20 J/cm² delimitou a indiferença entre os efeitos desses tratamentos, com destaque para o grupo LED a 5 J/cm², que apresentou maior densidade de volume estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). A média de densidade volumétrica dos grupos tratados com Laser a 5 J/cm², LED e Laser a 20 J/cm² é estatisticamente igual ($p \leq 0,05$). O grupo Laser irradiado com 20 J/cm² foi a fonte de luz e a fluência que apresentaram menor densidade de volume em relação aos tratados, demonstrando ser estatisticamente significativa a diferença do grupo LED tratado com 5 J/cm² em relação ao grupo LASER tratado com 20 J/cm². Na tabela 2, verifica-se que o Laser com fluência de 20 J/cm² pôde apresentar uma tendência de um processo inicial de saturação celular, sem evidências de inibição das atividades funcionais.

FIGURA 20. Taxa de crescimento da densidade de volume dos vasos sanguíneos em função dos dias de análise dos grupos Laser com fluência de 5 J/cm² (LASER5), Laser com fluência de 20 J/cm² (LASER20) e CONTROLE (ausente de tratamento).

No término do tratamento convencionado (21 dias), os animais irradiados nos grupos Laser e LED com 5 J/cm² demonstraram uma elevada e significativa similaridade vascular ($p \leq 0,05$), porém, entre os dois grupos citados anteriormente, somente o Laser demonstrou diferença estatística dos demais grupos analisados neste estudo ($p \leq 0,05$) (Tabela2). Diante de longos períodos, o grupo Laser com 5 J/cm² apresentou um crescimento exponencial em relação ao LED com 5 J/cm². A taxa de densidade volumétrica dos vasos sanguíneos irradiados com as tecnologias Laser e LED a 5 J/cm² foi em média de $28 \cdot 10^{-3}$ e $8.5 \cdot 10^{-3}$ densidade de volume vascular por dia, respectivamente. (Figura 21). A média dos grupos LED com 5 e 20 J/cm² além do Laser a 20 J/cm² é estatisticamente igual na vascularização da pele. As tendências de saturação do grupo Laser irradiado com 20 J/cm² (LASER20) no 14º dia confirmaram-se no 21º dia com uma similar significância estatística ao grupo CONTROLE, demonstrando que tanto o grupo CONTROLE quanto o Laser a 20 J/cm² tinham uma reduzida taxa de crescimento vascular em relação aos outros grupos fototratados. (Figura 20).

FIGURA 21. Taxa de crescimento da densidade de volume dos vasos sanguíneos em função dos dias de análise dos grupos Laser com fluência de 5 J/cm² (LASER5), LED com fluência de 5 J/cm² (LED5) e CONTROLE (ausente de tratamento).

4.3. Histomorfometria Vascular do Centro e das Margens da Ferida

A histomorfometria na angiogênese da ferida foi dividida em três campos de análise da densidade de volume dos vasos sanguíneos. Dois campos foram analisados nas margens e um no centro da lesão.

A média da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos foi comparada no teste-t, demonstrando que não existia diferença estatística significativa entre a borda e o centro da ferida nos dias de análise (3, 7, 14 e 21 dias) ($p \leq 0,05$) (Figura 22)..

FIGURA 22. Média da Densidade de Volume de Vasos Sanguíneo analisados nas margens e no centro da ferida ao longo dos dias de análise pós-tratamento. **A)** 3 dias; **B)** 7 dias; **C)** 14 dias; **D)** 21 dias. Os cinco grupos estudados se dividem em LED com fluência de 5 J/cm² (LED5); Laser com fluência de 5 J/cm² (LASER5); LED com fluência de 20 J/cm² (LED20); Laser com fluência de 20 J/cm² (LASER20) e CONTROL (ausente de tratamento).

Tabela 3: Teste-t para comparação das médias da densidade de volume dos vasos sanguíneos nas margens e no centro da ferida

Grupos*	3º dia		7º dia		14º dia		21º dia	
	Estimativa	Pr > t	Estimativa	Pr > t	Estimativa	Pr > t	Estimativa	Pr > t
Controle	-0.0033 ± 0,01	0.90	-0.0050 ± 0.02	0.08	0.0001 ± 0.02	0.99	0.0045 ± 0.03	0.92
LASER 5	0.0100 ± 0,04	0.70	0.0111 ± 0.05	0.70	-0.0245 ± 0.02	0.26	0.0356 ± 0.05	0.48
LASER 20	0.0008 ± 0,04	0.97	0.0150 ± 0.05	0.61	-0.0312 ± 0.03	0.19	-0.0206 ± 0.12	0.68
LED 5 -	0.0413 ± 0.01	0.12	0.0661 ± 0.05	0.81	0.0183 ± 0.04	0.40	-0.0743 ± 0.10	0.14
LED 20	0.0403 ± 0.06	0.13	0.0170 ± 0.06	0.58	-0.0001 ± 0.03	0.99	-0.0216 ± 0.08	0.67

* Os cinco grupos estudados se dividem em Controle (ausente de tratamento); Laser com fluência de 5 J/cm² (LASER5); Laser com fluência de 20 J/cm² (LASER20); LED com fluência de 20 J/cm² (LED20); LED com fluência de 5 J/cm² (LED5). Em cada grupo foi comparado a diferença entre as margens e o centro da lesão. P < 0.05

FIGURA 23. Fotografia histológica (H.E) da angiogênese no 21º dia de análise com aumento de 400X: **A)** LASER irradiado com 5 J/cm²; **B)** LED irradiado com 5 J/cm²; **C)** LED irradiado com 20 J/cm²; **D)** Laser irradiado com 20 J/cm²; **E)** Controle. As setas indicam a presença de vasos sanguíneos. As setas verdes indicam os vasos sanguíneos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Contração da Ferida

O processo de contração das feridas é comumente quantificado pela medida da aproximação das margens do tecido. Neste aspecto, alguns trabalhos demonstram resultados positivos tanto para Laser quanto para LED (CAPON *et al.*, 2001; WHELAN *et al.*, 2001; AL WATBAN e ANDRES, 2003; WHELAN *et al.*, 2003). Por outro lado, há relatos científicos da ocorrência de divergências ou até mesmo efeitos negativos nos tecidos biológicos quando há a interação com as fontes de luz ausentes de coerência (LEDs) em relação à luz coerente (Laser). PÖNTINEN *et al* (1996), afirmou que o fluxo sanguíneo intracraniano foi reduzido em humanos com a aplicação do LED, e com o Laser ocorreu um aumento satisfatório deste fluxo. HODE, (2005), por meio de uma revisão bibliográfica afirmou que as respostas biológicas dependem da coerência da luz, justificando uma maior eficiência em relação à luz incoerente. Entre as diversas razões para tais discrepâncias nestas fontes de luz, pode-se mencionar a ampla variedade de modelos experimentais disponíveis, método de avaliar os resultados, diferenças do comprimento de onda, fluências, potências e irradiâncias, além das condições de tratamento. Sendo assim, procurou-se nesta pesquisa, trabalhar em condições tais que mantiveram, dentro do possível, a similaridade das variáveis existentes dos parâmetros de cada fonte de luz.

No presente estudo, com a aproximação do comprimento de onda e irradiâncias, além da similaridade das doses de energia, não houve diferença estatisticamente significativa na contração das feridas com o tratamento por ambas as fontes de luz em relação ao grupo controle em todas as etapas de análise. Semelhantes resultados foram demonstrados por ANNEROTH *et al.* (1988) e WALKER *et al.* (2000) utilizando lasers diodo com comprimento de onda de 660 nm. Por outro lado, WHELAN *et al.* (2001) e AL-WATBAN *et al.* (2003) obtiveram uma redução da área da ferida de ratos

diabéticos em relação aos animais controles com a ledterapia ajustada a 4 J/cm² e 5 J/cm² respectivamente, com a importante observação que houve apenas discreta redução da área da ferida para os animais não-diabéticos. Esses resultados sugerem que o elevado metabolismo de ratos normais (MEYER *et al.*, 2003) é capaz de, facilmente, reparar as feridas cirúrgicas provocadas, não permitindo que as terapêuticas fotônicas manifestem seu efeito estatisticamente. O mesmo talvez não ocorra em situações que limitem o metabolismo celular, como a isquemia tecidual ou a presença de elevada concentração de espécies de oxigênio reativo. Nessas situações extremas, a energia transmitida pela terapia luminosa talvez represente o diferencial necessário para acelerar o reparo.

A tabela 1 mostra, nos primeiros três dias, que a taxa porcentual dos grupos tratados com 5 J/cm² apresentavam uma tendência positiva em relação aos outros grupos. A diferença aproximada do grupo LASER e LED a 5 J/cm² foi de 5% e 8% respectivamente, em relação aos grupos CONTROLE, LASER e LED a 20J/cm². Essas observações são comparáveis ao de MEDRADO *et al.* (2003), aplicando com maior êxito fluência de 4 J/cm² em relação a 8 J/cm², com grande redução da área da ferida, especialmente observada em 24 e 72 horas após o tratamento com laser diodo (670nm), se correlacionado com proeminente presença de miofibroblastos. Já é conhecido que a contração da ferida é influenciada principalmente pela ação dos miofibroblastos e pela produção de colágeno (SURINCHAK *et al.*, 1983).

A provável tendência na efetiva contração das feridas por meio das fontes luminosas ajustadas a 5 J/cm² nos primeiros dias de análise, visualizada na figura 14, pode ser devida à elevada eficiência fotomodulante do processo inflamatório. Em trabalho anterior, e com protocolo semelhante a este estudo, observou-se que animais irradiados com LED e Laser a uma fluência de 5 J/cm² apresentavam redução das células inflamatórias nos primeiros três dias de análise, verificando uma modulação do processo inflamatório, e eficiente resposta na proliferação de colágeno ao longo dos 21 dias em relação ao grupo controle (CORAZZA *et al.*, 2005). Esses achados são confirmados por HONMURA *et al.* (1992); PESSOA *et al.* (2004) e MEDRADO *et al.* (2003), que justificam a utilização da LLLT com doses de energia seguindo o modelo da Curva básica de Arndt-Schultz como eficientes reguladores do processo inflamatório.

Quando se descrevem os efeitos fotomoduladores no processo inflamatório, sugere-se que ocorre inicialmente um aumento das células inflamatórias no local de lesão, removendo rapidamente o excesso de detritos celulares, conseqüentemente

reduzindo o número das células inflamatórias e dinamizando a sua funcionalidade na produção de fatores de crescimento. (WHELAN *et al.*, 2001).

Com o possível estímulo na liberação desses fatores de crescimento, ocorreu nos primeiros dias uma significativa fotoestimulação dos vasos sanguíneos dos grupos tratados em relação ao controle, com uma tendência eficiente na proliferação de vasos sanguíneos com a fluência de 5 J/cm² em ambas as fontes de luzes, sendo o efeito angiogênico mostrado na figura 17. Como consequência, sugere-se que a contração da ferida pode ter sido favorecida pela revascularização da pele, com maior atividade da circulação sanguínea e possivelmente da linfática, favorecendo o auxílio da drenagem de depósito de óxidos promovidos pelo acúmulo de ácido lático, associado à hipertensão dos tecidos. O mesmo foi discutido por ÖZKAN *et al.* (2004) e KOBAYASHI *et al.* (1999). Essas informações de aumento do fluxo sanguíneo podem ser confirmadas pelo trabalho de MAEGAWA *et al.* (2000), mostrando que a laserterapia de baixa intensidade é capaz de induzir vasodilatação arterial por ação do aumento da síntese de óxido nítrico (NO). TAM (1999) cita em seu artigo que o laser de baixa intensidade age na síntese de prostaglandina, a qual possui ação vasodilatadora e antiinflamatória. Por outro lado, LONGO (2000) relata que o efeito antiedematoso ou aumento da drenagem linfático-venosa de superfícies irradiadas é somente evidente em casos de estase linfático-venosa.

Apesar do presente trabalho não mensurar os efeitos bioelétricos da terapia luminosa na atividade celular, os resultados sugerem ação positiva na contração das feridas dos animais irradiados com 5 J/cm² no 3º dia, sugerindo que as fontes de luz em questão no estudo podem ter atuado como normalizadores dos canais da membrana plasmática e da atividade iônica das células, com consequente equilíbrio da voltagem transcutânea da pele. LOW e REED (2001) afirmam que em condições fisiológicas normais, o estrato córneo tem cargas negativas em relação à derme. Entretanto, quando é induzida uma lesão na pele, ocorre a instalação de processo inflamatório. Sendo assim, acredita-se que íons carregados positivamente movem-se da epiderme para o leito da ferida por falha na ação homeostática da bomba de sódio das células epidérmicas, promovendo o desequilíbrio da voltagem transcutânea da pele e dificultando a cicatrização do tecido. Do mesmo modo, RIBEIRO *et al.* (2002) sugerem que a polarização do componente do campo elétrico exerce importante papel na cicatrização da pele. Neste sentido, os efeitos bioelétrico do Laser já são conhecidos como atuantes

na normalização das bombas iônicas na membrana plasmática, promovendo o equilíbrio da voltagem transcutânea (GENOVESE, 2000).

Do sétimo dia em diante, a contração da ferida em relação aos grupos tratados e controle não sofreu influência estatisticamente significativa no tratamento. Mas algumas tendências na contração das feridas foram evidenciadas. O grupo LASER com fluência de 20 J/cm² apresentou discreta elevação na taxa porcentual da contração da ferida em relação ao grupo CONTROLE, com uma diferença de 7%, conforme visualizado na tabela 1. No 14º dia havia respectivamente diferença de apenas 4% e 5% dos grupos LASER a 20 J/cm² em relação aos grupos CONTROLE e LED a 5 J/cm². Do mesmo modo, porém com resultados significativos, AL-WATBAN *et al.* (1999) obtiveram resultados semelhantes quando aplicaram fluências de 20 J/cm², por meio de um laser He-Ne de 40mW. Em outro experimento AL-WATBAN e ZHANG (1997) avaliaram o laser com dose de energia de 20 J/cm², que proporcionava maior eficiência na contração das feridas quando comparada a outras fluências. Por outro lado, vários autores confirmam que fluências ajustadas na Curva Básica de Arndt-Schultz são ideais para tratamento da redução de feridas (KANA *et al.*, 1981; KIM *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2002; MEDRADO *et al.*, 2003).

Com base nos resultados deste estudo e de outros publicados na literatura, pode-se sugerir que a contração das feridas isquêmicas ou crônicas de ratos é beneficiada com a terapia luminosa de baixa intensidade coerente ou ausente de coerência. Do mesmo modo, há a sugestão de que a ledterapia ou a laserterapia de baixa intensidade poderão atuar de modo positivo em úlceras isquêmicas ou crônicas de indivíduos humanos. TAM *et al.* (1999); LAGAN *et al.* (2000) e WHELAN *et al.* (2001) desenvolveram estudos com LEDLLT ou LLLT em úlceras crônicas de humanos, obtendo resultados positivos na redução da área irradiada.

5.2.2. Angiogênese

Estudos sobre fotobiomodulação na neoformação de vasos sanguíneos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas, verificando os efeitos positivos dessas fontes de luz, sendo o laser de baixa intensidade a fonte mais pesquisada e com maior administração nas clínicas especializadas na reparação tecidual e no tratamento álgico. Por outro lado, o LED de baixa intensidade possui uma restrita base literária, na qual são questionados

os efeitos positivos e similares a LLLT. Controvérsias nas respostas com a terapia luminosa em relação à coerência são freqüentemente na literatura atual. HODE (2005) justifica vários estudos que descrevem a ineficiência da terapia luminosa de baixa intensidade ausente de coerência, mas não discrimina os estudos de elevado cunho científico de WHELAN *et al.* (2001); AL-WATBAN *et al.* (2003), VINK *et al.* (2003) e WHELAN *et al.* (2003) na excelência da fotomodulação celular com a LEDLLT. Sendo assim, por meio deste presente trabalho, há a expectativa de colaborar com a recente literatura sobre a interação positiva da luz ausente de coerência e colimação no tecido biológico.

Nesta pesquisa, as médias de densidade de volume dos vasos sanguíneos dos grupos tratados no 3º dia foram similares entre si e significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$), como visto na tabela 2. Os estímulos iniciais das luzes coerente e ausente de coerência, independente da dose de energia, proporcionaram uma resposta angiogênica elevada, sendo esta fase a mais importante do experimento, visto que as posteriores fases de análise nada mais foram que uma seqüência de respostas às fluências aplicadas ao tecido. Do mesmo modo, SALATE (2004) irradiou tendões calcâneos de rato, obtendo resultados angiogênicos similares no terceiro dia de análise por meio de um laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 660 nm.

As fontes de luz administradas neste estudo, ajustadas com fluência de 5 J/cm², demonstraram tendências positivas tanto na neovascularização do leito da ferida como na contração da lesão no terceiro dia de análise. Esse resultado pode estar associado à redução das células inflamatórias, conforme sugerido por CORAZZA *et al.* (2005), MEDRADO *et al.* (2003) e AMANO *et al.* (1994), diferindo dos resultados obtidos de RICEVUTI *et al.* (1989). Paralelamente, ficou a contraposição proposta por YOUNG *et al.* (1989) e AGAIBY *et al.* (2000) que afirmaram que baixas densidades de energia podem aumentar a atividade funcional dessas células, com a provável elevação na liberação de citocinas e fatores de crescimento por macrófagos, linfócitos T, plaquetas, células endoteliais, fibroblastos e queratinócito. Essa dupla atividade antagônica no processo inflamatório caracteriza as terapias fotônicas como biomoduladoras, ou seja, ao mesmo tempo em que reduzem o número de algumas células inflamatórias devido à maior resposta de debridaço do tecido lesado, também estimulam o funcionamento dessas células para a liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é o principal estimulador para a produção das células

endoteliais, além de outros fatores de crescimento como o de crescimento fibroblástico (FGF), contribuindo assim para antecipar a fase de proliferação vascular.

Com a utilização da LLLT ou da LEDLLT, os autores KIPHIDZE *et al.* (2001), WHELAN *et al.* (2003) e ROCHKIND *et al.* (2004) sugerem que o aumento da angiogênese provavelmente é influenciado pela elevação na indução que o TGF- β exerce sobre o RNA-m do VEGF, o qual tem sido mediado por sistemas de segundos mensageiros intracelulares como o cálcio, tirosina, proteína quinase e monofosfato cíclico, resultando em aumento da proliferação e remodelação das células endoteliais.

Apesar da ausência da quantificação da produção de fatores de crescimento, os resultados desta pesquisa sugerem que os tratamentos por ambas as fontes de luz podem ter estimulado a produção de fatores de crescimento, e, além disso, podem ter promovido a estabilidade dos receptores de fatores de crescimento, otimizando a captura dos mesmos. Segundo afirma SILVERTHORN (2003), os receptores de crescimento são instáveis em feridas agudas e principalmente em crônicas. Essa hipótese é substantiada pela elevada proliferação de vasos sanguíneos dos animais tratados em todas as fases de análise, principalmente no 3º e 21º dias, com exceção parcial do grupo LASER irradiado com fluência de 20 J/cm².

Os primeiros dias de análise foram decisivos para a evolução vascular, como visto na tabela 2. Do mesmo modo, WHELAN *et al.* (2001) verificaram um pico de incidência do FGF nos primeiros quatro dias, mas no 14º dia o fator decrescia, porém mantendo-se maior em relação ao controle quando os animais foram irradiados com 4 J/cm² por meio de um LED (880 nm). Diferente dos resultados de WHELAN, a estabilização do crescimento dos vasos sanguíneos não foi evidente no término do experimento dos grupos tratados no atual trabalho. Isso sugere que o espectro eletromagnético vermelho administrado neste estudo promove maior ativação dos fatores de crescimento, estimulando a atividade mitogenética das células endoteliais, que são precursoras da neovascularização. Do mesmo modo, AMIR (2000) afirma que o comprimento de onda vermelho é o mais indicado para a angiogênese. Os resultados verificados nas figuras 17, 18 e 19 contrariam os estudos de LOCKHART (2003), visto que, em 14 dias de análise das feridas induzidas em humanos, foi verificado um estágio inicial de regressão vascular. Entretanto, neste estudo, não ocorreu nenhuma intervenção terapêutica. A contínua vascularização da pele dos ratos pode ter ocorrido devido ao tratamento luminoso manter elevada a taxa metabólica dos animais em questão.

Já para os animais do grupo controle houve, como observado na figura 16, uma baixa densidade de volume dos vasos sanguíneos no 3º dia, sendo a taxa angiogênica constante até o 21º dia. Em conformidade com esses resultados, KARU (2003) afirma que, em condições patológicas, ocorre o aumento da concentração de óxido nítrico produzido por macrófagos, diminuindo assim a atividade respiratória celular, bem como produzindo espécies de oxigênio reativo (ROS).

Quando administrada a dose de energia de 5 J/cm², a tendência positiva da densidade volumétrica de vasos sanguíneos indica que há prováveis efeitos moduladores sobre o NO. Mesmo sem mensurar a presença de NO, podemos sugerir que as terapias fotônicas deste estudo podem ter promovido um processo de modulação em níveis fisiológicos de NO na ferida dos ratos. A partir de análises específicas, KIPSHIDZE *et al.* (2001) relataram que ocorria a modulação dos níveis de NO diante de baixas doses de energia.

A elevada fluência de 20 J/cm² aplicada na fase inicial da pesquisa não promoveu saturação celular, visto que a energia administrada era capaz de ser absorvida pelas células endoteliais, devido ao seu baixo metabolismo. Entretanto, após tempo prolongado de tratamento com Laser a 20 J/cm² (21 dias), é possível que não existiam moléculas suficientes para absorver a energia irradiada, visto que as densidades volumétricas de vasos sanguíneos se assemelharam estatisticamente aos animais do grupo controle. Entretanto, apesar de não quantificarmos a produção de antioxidantes, pode-se sugerir que talvez alguma ação antioxidante tenha sido prejudicada, resultando no processo do tipo saturação, pois a densidade volumétrica de vasos sanguíneos se assemelhou à do grupo controle. Realizando análises específicas, KIM *et al.* (2000) e VIRAG *et al.* (2002) obtiveram resultados de saturação celular com alta dose de energia (5 e 7 J), devido à inibição da produção de catalase e superóxido dismutase, facilitando o avanço deletério dos radicais livres sobre o DNA.

A análise dos efeitos angiogênicos no 21º dia do experimento demonstrou que o tratamento com 5 J/cm² estimulou a angiogênese de forma mais intensa que o tratamento a 20 J/cm². Esses resultados são confirmados pela maioria das pesquisas que utilizam a curva Básica de Arndt-Schultz para justificar a fotomodulação vascular em feridas cutâneas (AMIR *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2001; MEDRADO *et al.*, 2003). Em outro estudo em humanos, a irradiação com fluência elevada (30 J/cm²) estimulou o aumento da microcirculação em úlceras diabéticas (SCHINDL *et al.*, 1998).

Os resultados visualizados na figura 21, principalmente no 21º dia, tanto LLLT com 5 e 20 J/cm², e LEDLLT a 5 J/cm², foram capazes de promover o aumento do número e diâmetro dos vasos sanguíneos, sugerindo uma elevação do fluxo sanguíneo na região lesada. Confirmando esses resultados, TACHIHARA *et al.* (2002) citam a melhora da perfusão de sangue e drenagem de resíduos metabólicos em seus estudos com luz ausente de coerência. Como foi sugerido um maior aporte de sangue rico em oxigênio, alfa cetoglurato, ácido ascórbico e ferro para o tecido lesado do presente estudo, os resultados podem ter favorecido uma melhor formação de colágeno. Essa deposição de colágeno é direta e significativamente proporcional à tensão e à intensidade de perfusão do oxigênio no tecido lesado (JONSSON *et al.*, 1991; HARTMANN *et al.*, 1992). Por outro lado, há evidências de que a luz coerente é mais efetiva em relação à luz incoerente na promoção do aumento do fluxo sanguíneo (PÖNTINEN *et al.*, 1996).

Confirmando os resultados positivos dos efeitos angiogênicos com ambas as terapias fotônicas, vários estudos justificam a biomodulação com a luz incoerente (KANA *et al.*, 1981; YOUNG *et al.*, 1989; PÖNTINEN *et al.*, 2000; WHELAN *et al.*, 2001; WHELAN *et al.*, 2002; WHELAN *et al.*, 2003; KARU, 2003; e VINK *et al.*, 2003). Outros afirmam que a luz terapêutica incoerente é menos eficiente ou mesmo incapaz de promover efeitos fototerapêuticos em relação à luz coerente (BIHARI e MESTER, 1989; BERTOLONI *et al.*, 1993; ANTIPA *et al.*, 1996, LAAKSO *et al.*, 1997, ALEMÁN *et al.*, 2001).

A partir dos resultados deste estudo, verifica-se que a coerência da luz não é determinante para a biomodulação. KARU (2003) afirma que a coerência é perdida nos primeiros estratos da pele. HODE (2005) justifica que a coerência não desaparece, mas se reduz ao longo da penetração do tecido, exercendo ainda esta influência física na área irradiada. Entretanto os resultados da presente pesquisa sugerem que é possível influenciar a angiogênese com as fontes de luz LED e LASER de baixa intensidade empregando baixas doses de energia, em que a terapia luminosa não depende da coerência, mas sim da absorção da luz em uma determinada banda espectral.

O espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo em relação ao do LASER. Apesar dessa propriedade diferenciar as luzes terapêuticas, há similar concentração energética na área de ação de ambas, porém com distribuição diferenciada. No LED, a densidade de energia está distribuída em uma maior banda do espectro eletromagnético em relação ao Laser, podendo interagir com um maior grupo

de fotorreceptores específicos. Mas a densidade de energia total difere nas luzes incoerentes e coerentes, visto que existe uma menor energia por faixa espectral para o LED em relação ao LASER. Mesmo diante dessas diferenças na distribuição da energia, pode-se sugerir que há uma ampla janela biológica de absorção da luz nos tecidos biológicos diante da aplicação dessas luzes, permitindo a ação terapêutica nos respectivos receptores de luz. Por isso, podemos verificar que a diferença no volume de vasos sanguíneos dos animais tratados com LED a 20 J/cm² e a 5 J/cm² não é estatisticamente significativa, porém no 21º dia se verifica uma tendência similar ao LASER com dose de 20 J/cm², mas com um diferencial bem menor.

Devido ao feixe luminoso do LED ser maior em relação ao LASER, a potência do LED teve de ser maior em relação à do LASER para o ajuste de irradiâncias semelhantes entre os equipamentos. Todas as fontes de luz utilizadas nesta pesquisa eram de baixa potência, tendo sido definidos 40 mW para o LASER e 90 mW para o LED.

Diante da potência e da área do feixe de luz de ambas as fontes, foi verificada uma irradiância elevada. E concordando com parâmetro deste estudo, TUNÉR e HODE (2002) relatam que elevadas densidades de potências são favoráveis para produzir benéficos efeitos biomoduladores para o tecido irradiado.

Os LEDs utilizados no passado não eram muito efetivos devido à intensidade das tecnologias serem inferiores às do LASER, o que não ocorre atualmente (BAGNATO, 2002). Do mesmo modo, VINK *et al.* (2003) obtiveram resultados positivos utilizando LED (660 nm) com potências de 80 mW e LLLT (670 nm) com 40 mW em cultura de fibroblastos, concordando com os resultados do atual estudo. Mas outro trabalho utilizando LED com potência superior ao LASER não promoveu resultados efetivos no aumento do fluxo sanguíneo, julgando que a coerência era fator diferencial na resposta biológica (PÖNTINEN *et al.*, 1996). Quando comparamos fontes de LASER e LED, devemos ressaltar a irradiância da luz, e não a potência do feixe de luz, uma vez que a razão da potência em relação à área do feixe luminoso (W/cm²) é um fator determinante da irradiância real aplicada no tratamento, visto que o feixe de luz do LED geralmente é maior que o do Laser.

Além da procura da adequação da densidade de potência, este estudo procurou irradiar adequadamente a densidade de energia na pele lesada dos ratos. Por meio da distribuição homogênea da densidade de energia na área da ferida, pôde-se sugerir uma resposta similar na concentração de vasos sanguíneos nas margens e no centro da ferida.

Sabe-se que a reparação se inicia nas margens da ferida devido às baixas condições de oxigênio e nutrientes no centro da lesão e, provavelmente, a fototerapia alterou essa condição, gerando ambiente propício para a neoformação homogênea de vasos sanguíneos. Diferente deste resultado, LOCKHART *et al.* (2003) relataram que a maioria dos microvasos foi encontrada na periferia da ferida proporcionada por “punch”, entretanto este estudo não sofreu nenhuma intervenção terapêutica. Do mesmo modo que o atual estudo, SCHINDL *et al.* (1999) obtiveram aumento significativo e similar da vascularização nas margens e no centro da lesão de pacientes tratados com laser He-Ne (10mW e 30 J/cm²).

Diante das respostas benéficas do tratamento das fontes de luz deste estudo, é possível inferir que as respostas angiogênicas das feridas dos ratos deste experimento podem ser transpostas para feridas de seres humanos, uma vez que CHEN *et al.* (1999) afirmam que as várias chaves bioquímicas encontradas em feridas agudas e crônicas de humanos, como elevados níveis protéicos e Fatores de Necrose Tumoral – α , estão presentes em feridas de ratos.

Da mesma forma que os efeitos biomoduladores foram similares entre o Laser e o LED de baixa intensidade, as contra-indicações físicas e biológicas são mantidas as mesmas. A partir do ano 2000, a Comissão Internacional sobre Proteção da Radiação Não-Ionizante publicou um artigo relatando que a irradiação do LED promove riscos de lesão na retina tanto quanto o Laser, preconizando a manutenção da utilização de óculos protetores para o comprimento de onda utilizado no tratamento em questão.

Comparando o LED ao Laser de baixa intensidade na angiogênese da pele lesada, foi evidente que a utilização de ambas as fontes de luz são aceitáveis, sendo preferencialmente aplicadas com fluências ajustadas pela curva Básica de Arndt-Shultz. Com o reduzido custo desses diodos emissores de luz em relação ao diodo de laser, há a expectativa dos equipamentos incorporarem uma maior quantidade de diodos, contribuindo para o aumento da área de saída do feixe luminoso. Com isso poderá ocorrer a dinamização do tempo de tratamento dos pacientes acometidos por feridas com grandes dimensões e quadro algícos difusos. Assim, a LEDLLT surge como uma terapia alternativa a LLLT, pois, além de ser comercialmente acessível, tem a capacidade de promover efeitos benéficos e semelhantes no processo de reparação tecidual.

6. CONCLUSÕES

- 1) Os tratamentos por irradiação a Laser e LED não influenciaram a redução da ferida de forma significativamente diferente;
- 2) Os estímulos fotônicos nos primeiros três dias foram decisivos para a evolução do tratamento na evolução da densidade de volume dos vasos sanguíneos;
- 3) Fototerapia a 5 J/cm² apresentou maior vascularização em relação aos outros grupos, principalmente no término do tratamento;
- 4) Fluência de 20 J/cm² do LLIT demonstrou no 21º dia um processo de saturação celular;
- 5) Não ocorreu diferença angiogênica entre a borda e o centro da lesão;
- 6) A fonte luminosa LED pode ser eficiente substituta à fonte Laser de baixa intensidade, visto que a coerência da luz não se demonstrou essencial na atividade angiogênica.

6.1. Sugestões para trabalhos futuros

- Induzir lesões circulares por queimadura no dorso de ratos e analisar quantitativamente o número de macrófagos e fibroblastos por meio de imuno-histoquímica. Técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para avaliar a formação de fatores de crescimento (VEGF e FGF-2) e a conseqüente formação de células endoteliais;
- Realizar ensaios mecânicos para avaliar a resistência tênsil do tecido cutâneo quando tratado por meio das terapias fotônicas Laser e LED;
- Desenvolver protocolos de feridas isquêmicas associadas à diabetes induzida artificialmente em ratos, analisando de forma macroscópica a epitelização do tecido e as influências na modulação do processo inflamatório, das fibras colágenas e dos vasos sanguíneos;

- Trabalhar com a padronização das doses energéticas em função do efeito desejado da terapia LED, pois, quando esta luz adentra o tecido, há uma promoção de um certo espalhamento, distribuindo a densidade de energia do espectro eletromagnético, diferentemente do laser, que é todo concentrado em um determinado pico. Sendo assim, ocorre a necessidade de estudar a padronização da fluência para tratar as diferentes condições patológicas que acometem o homem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAIBY, A.D. et al. (2000). Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.26, n.4, p.357-363, May.

AIRES, M.M. (1999). *Fisiologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

ALEMÁN, C.V. et al. (2001). Evaluation of motor and sensory neuroconduction of the median nerve in patients with carpal tunnel syndrome treated with non-coherent light emitted by gallium arsenic diodes. *Revista de Neurología*, v.32, n. 8, p. 717-720, May.

AL-WATBAN, F.A.H.; ANDRES, B.L. (2000). Effect of He-Ne laser (632.8 nm) and PolygenTM on CHO cells. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.18, n.3, p.145-150.

_____. (2003). Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.21, n.5, p.249-258.

AL-WATBAN, F.A.H.; ZHANG, X.Y. (1997). Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.15, n.5, p.209-215.

_____. (1999). The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Therapy*, New York, v.11, n.1, p.6-10, Mar.

AMANO, A. et al. (1994). Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.15, p.290-294.

AMIR, A. et al. (2000). The influence of helium-neon irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *British Journal of Plastic Surgery*, Edinburgh, v.53, n.1, p.58-62, Jan.

ANDERS, J.J. et al. (1993). Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.13, n.1, p.72-82.

THE ANGIOGENESIS FONDATION (2000). *Understanding angiogenesis*. Disponível em: <http://www.angio.org/understanding/content_understanding.html>. Acesso em: 28 Nov. 2004.

ANNEROTH, G. et al. (1988). The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, London, v.26, n.1, p.12-17, Feb.

ANTIPA, C. et al. (1996). Low-power coherent and noncoherent light in clinical practice. *SPIE Proceeding*, v. 2929, p. 119-123.

BAGNATO, V.S. (2002). *Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora*. BR n. PI0200200-0, 23 jan. 2002, 14 out. 2003.

BASFORD, J.R. (1995). Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.16, p.331-342.

BAXTER, G.D. (1994) *Therapeutic lasers: theory and practice*. New York: Ed. Churchill Livingstone, p.259.

_____. (1998). Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. (Org.). *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo: Manole.

BAXTER, G.D. et al. (1991). Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy*, London, v.77, n.3, p.171-178, Mar.

BECIT, N.; AKIN, Y. (2001). The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis: an experimental study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, London, v.22, n.4, p.310-316, Oct.

BEDNARSKA, K. et al. (1998). Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast. *Radiation and Environmental Biophysics*, Berlin, v.37, n.3, p.215-217, Nov.

BERARD, A. et al. (2002). Risk factors for the first-time development of venous ulcers of the lower limbs: the influence of heredity and physical activity. *Angiology*, Baltimore, v.53, n.6, p.647-657, Nov./Dec.

BERTOLONI, G.; et al. (1993). Biochemical and morphological changes in *Escherichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. *Journal of Photochemistry and Photobiology – B: biology*, Lausanne, v.18, 2/3, p.191-196, May.

BIHARI, I.; MESTER, A. (1989). The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standing crural ulcer using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers and non coherent light: Preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Therapy*, v. 1, n. 2, p. 97.

BISHT, D. et al. (1999). Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian Journal Experimental Biology*, New Delhi, v.37, p.187-189, Feb.

BRAVERMAN, B. et al. (1989). Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.9, p.50-58.

CAPON, A. et al. (2001). Laser assisted skin closure (lasc) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.28, n.2, p.168-175, Feb.

CARVALHO, P.T.C. et al. (2001). Os efeitos do laser de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes melitus experimental. *Fisioterapia Brasil*, Rio de Janeiro, v.2, n.4, p.241-246.

CHARMAN, R.A. (1990). Part 2: cellular reception and emission of electromagnetic signals. *Physiotherapy*, London, v.76, n.9, p.509-516, Sept.

CHEN, C. et al. (1999). Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wound as a model for human chronic wounds. *Wound Repair Regeneration*, Chicago, v.7, n.6, p.486-494, Nov.

CHU, C.S. et al. (1996). Direct current reduces wound edema after full-thickness burn injury in rats. *Journal of Trauma*, Baltimore, v.40, n.5, p.738-742.

COOMBE, A.R. et al. (2001). The effects of low laser irradiation on osteoblastic cells. *Clinical Orthodontics and Research*, Copenhagen, v.4, n.1, p.3-14, Feb.

CORAZZA, A.V. et al. (2005). Comparative pilot-study of the effect of low level laser treatment and light emitting diode in the healing of induced wounds in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* v. 23, n. 1, p.89-151. February Abstracts from 5 th WALT CONGRESS, São Paulo, Brazil.

COTRAN, R.S. et al. (2000). *Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 6ª ed. 1251 p.

DaCOSTA, R. S, et al (2003). Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, v.78, n.4, p.384-392.

DANHOF, G. (2000). Biological effects of the laser beam. In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.127-152.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. (2001). *Bases da biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

DOWSETT, C. (2004). The use of silver based dressings in wound care. *Nursing Standard*, Cardiff, v.19, n.7, p.56-60.

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. (1990). Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.19, n.6, p.559-568.

_____. (1996). Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.19, n.4, p.433-437, Dec.

- FUJIMAKI, Y. et al. (2003). Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.21, n.3, p.165-170.
- FINSTERBUSH, A.; ROUSSO, M.; ASHUR, H. (1982). Healing and tensile strength of CO₂ laser incisions and scalped wounds in rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Baltimore, v.70, n.3, p.360-362.
- GENOVESE, W.J. (2000). *Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia*. São Paulo: Lovise.
- GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N.A. (1998). Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, São Carlos, v.3, n.1, p.5-13.
- GUPTA, N. et al. (2004). An Indian community-based epidemiological study of wounds. *Journal of Wound Care*, London, v.13, n.8, p.323-325.
- GUIDUGLI-NETO, J. (1997). *Elementos da patologia geral*. São Paulo: Santos.
- HALL, G. et al. (1994). Effect of low level energy laser irradiation on wound healing: an experimental study in rats. *Swedish Dental Journal*, Stockholm, v.18, p.29-34.
- HARTMANN, M.; JONSSON, K.; ZEDERFELDT, B. (1992). Effect of tissue perfusion and oxygenation on accumulation of collagen in healing wounds. Randomized study in patients after major abdominal operations. *European Journal of Surgery*, Oslo, v.158, n.10, p.521-526.
- HESS, C.T. (2002). *Tratamento de feridas e úlceras*. 4.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso.
- HODE, L. (2005). The importance of the Coherency. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont, v.23, n.4, p.431-434.
- HONNURA, A. et al. (1992). Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.12, p.441-449.
- HOW STUFF WORKS (2002). *How can a diode produce light?*. Disponível em: <<http://www.electronics.howstuffworks.com/led2.htm>>. Acesso em: 12 Dec. 2004.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION (2000). ICNIRP statement on light-emitting diodes (LEDs) and laser diodes: implications for hazard assessment. *Health Physics*, New York, v.78, n.6, p.744-752.
- ISHII, S. et al (2004). Appropriate control of ex vivo gene therapy delivering basic fibroblast growth factor promotes successful and safe development of collateral vessels in rabbit model of limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, v.39, n.3, p.629-638.

ISSHIKI, M. et al. (1998). Endothelial Ca^{+2} waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.95, n.9, p.5009-5014, Apr.

JOHNSON, J.G. (2003). *Biology II: anatomy & physiology*. Frederick: Frederick High School. Cap.46, Section 4. Disponível em: <<http://www.sirinet.net/~jgjohnso/integproject.html>>. Acesso em: 27 Feb. 2005.

JONSSON, K. et al. (1991). Tissue oxygenation, anemia and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Annals of Surgery*, Philadelphia, v.214, n.5, p.605-613.

JORGENSEN, L.N. (2003). Collagen deposition in the subcutaneous tissue during wound healing in humans: a model evaluation. *APMIS*, Copenhagen, v.111, Supl.115, p.1-56.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (2000). *Biologia celular e molecular*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

KANA, J.S. et al. (1981). Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Archives of Surgery*, Chicago, v.116, n. 3, p.293-296, Apr.

KARU, T. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology – B: biology*, Lausanne, v.49, n.1, p.1-17, Mar.

_____. (1993). Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.13, n.4, p.453-462.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. (1995). Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology – B: biology*, Lausanne, v.27, n.3, p.219-223, Mar.

KARU, T.I. (2003). Low-power laser therapy. In: VO-DINH, T. (Ed.). *Biomedical photonics handbook*. Tennessee: CRC PRESS.

KIM, Y.G.; PAK, S.C.; LEE, S.R. (2000). Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-ne laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.27, n.5, p.420-426.

KIPSHIDZE, N. et al. (2001). Low-power helium:neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.28, n.4, p.355-364, May.

KITCHEN, S.; YOUNG, S. (1998). Reparo dos tecidos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. (Ed.). *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo: Manole.

KLIMA, H. (2000). Biological effects of the laser beam. In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.75-96.

KOBAYASHI, M.; KUBOTA, J. (1999). Treatment of temporomandibular joint (tmj) pain with diode laser therapy. *Laser Therapy*, New York, v.11, n.1, p.11-18, Mar.

KREISLER, M. et al. (2002). Effect of diode laser irradiation on root surfaces in vitro. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.20, n.2, p.165-170.

KUJAWA, J. et al. (2003). Low-intensity near-infrared changes of acetylcholinesterase activity of human erythrocytes. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.21, n.6, p.351-355.

LAAKSO, E. et al. (1997). Pain scores and side effects in response to low level laser therapy (LLLT) for myofascial trigger points. *Laser Therapy*, v.2, n.9, p. 67-62.

LAGAN, K.M. et al. (2001). Low intensity laser therapy (830 nm) in the management of minor postsurgical wounds: a controlled clinical study. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.26, n.1, p.27-32, Dec.

LAGAN, K.M. et al. (2000). A case report of low intensity laser therapy (LILT) in the management of venous ulceration: potencial effects of wound debridement upon efficacy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.18, n.1, p.15-22.

LAGAN, K.M. et al. (2002). Low-intensity laser therapy / combined phototherapy in the management of chronic venous ulceration: a placebo-controlled study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.20, n.3, p.109-116.

LOCKHART, A.G. et al. (2003). A clinical model of dermal wound angiogenesis. *Wound Repair Regeneration*, Chicago, v.11, n.4, p.306-313, July.

LOK, C. et al. (2000). EMLA cream as a topical anesthetic for the repeated mechanical debridement of venous leg ulcers: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Saint Louis, v.42, n.1, p.146-148, Jan.

LONGO, L. (2000). Laser phlebology and lymphology. In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.373-380.

LOW, J.; REED, A. (2001). *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. São Paulo: Manole, p. 472.

LUCAS, C. et al. (2002). Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers in Medical Science*, London, v.17, n.2, p.110-134, June.

_____. (2000). Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. *Lasers in Medical Science*, London, v.15, n.2, p.84-93, Mar.

MAEGAWA, Y. et al. (2000). Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.27, n.5, p.427-437, Nov.

McDIARMID, T. et al. (1985). Ultrasound and the treatment of pressure sores. *Physiotherapy*, London, v.71, n.2, p.66-70, Feb.

MEDRADO, A.R.A.P. et al. (2003). Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.32, n.3, p.239-244.

MELO, C.A.S. et al. (2001). Characterization of light penetration in rat tissues. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.19, n.4, p.175-179.

MEYER, R.A. et al. (2003). Gene expressive in older rats with delayed union of femoral fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*, v. 85, p. 1243-1254.

MILGRAM, J. et al. (2004). The effect of short, high intensity magnetic field pulses on the healing of skin wounds in rats. *Bioelectromagnetics*, New York, v.25, n.4, p.271-277, May.

MASSONE, F. (1994). *Anestesiologia veterinária, farmacologia e técnicas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L.; MAZZULI, T. (2002). Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.20, n.6, p.325-333.

ÖZKAN, N. et al. (2004). Investigation of the supplementary effect of GaAs laser therapy on the rehabilitation of human digital flexor tendons. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.22, n.2, p.105-110.

PAIVA, L.A.F. et al. (2002). Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research*, London, v.16, n.8, p.737-739, Dec.

PASCU, M.L. (2000). Laser physics. In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.23-74.

PEREIRA, A.N. et al. (2002). Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.31, n.4, p.263-267, Apr.

PEREIRA, G.F.M. (2002). *Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas*. Cadernos de Reabilitação em Hanseníase; Série J, n.2, Ministério da Saúde.

PESSOA, E.S. et al. (2004). A histologic assesment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treatment animals. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont, v.22, n.3, p.199-204.

POGREL, M.A.; CHEN, J.W.; ZHANG, K. (1997). Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.20, n.4, p.426-432, Dec.

POLYTARCHOU, C.; PAPADIMITRIOU, E. (2004). Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down0regulation of nitric oxide synthases expression and activity. *Free Radical Research*, London, v.38, n.5, p.501-508, May.

_____. (2005). Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v.510, n.1/2, p.31-38, May.

PÖNTINEM, P.J. (2000). Laseracupuncture. In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.455-475.

PONTINEN, P.J. et al. (1996). Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl Diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acunpuncture and Electro-Therapeutics Research*, Elmsford, v.21, n.2, p.105-118.

REDDY, G.K. (2003). Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.33, n.5, p.344-351, Dec.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. (2001). Laser photostimulation accelerates healing in diabetic rats. *Wound Repair Regeneration*, Chicago, v.9, n.3, p.248-255, May.

REED, B.V. (1996). Wound healing and the use of thermal agents. In: MICHLOVITZ, S.L. (Ed.). *Thermal agents in rehabilitation*. 3.ed. Philadelphia: F.A.Davis.

RIBEIRO, M.S. et al. (2002). Effects of 1047-nm neodymium laser radiation on skin wound healing. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.20, n.1, p.37-40.

RICEVUTI, G. et al. (1989). In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte functions. *Inflammation*, v. 13, p.507-25.

ROCHKIND, M.D. et al. (2004). Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.22, n.3, p.249-253.

ROMANOS, G.E.; PELEKANOS, S.; STRUB, J.R. (1995). A comparative histological study of wound healing following Nd: YAG laser with different energy parameters and conventional surgical incision in rat skin. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.13, n.1, p.11-16.

ROSSMANN, J.; ISRAEL, M. (2000). Laser de-epitheliazation, for enhanced guided tissue regeneration. *Dental Clinics of North America*, Philadelphia, v.44, n.4, p.793-809, Oct.

SALATE, A.C.B. (2004). *Estudo dos efeitos do laser de baixa intensidade na angiogênese em ruptura parcial do tendão calcâneo de ratos*. 154 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. (2001). *Dermatologia*. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas. p. 1156.

SCHINDL, A. et al. (1998). Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care*, New York, v.21, n.4, p.580-584.

_____. (1999). Increase dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. *J. Am. A. Dermatol*, v. 40, n.3, p. 481-84.

_____. (2003). Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *British Journal of Dermatology*, London, v.148, n.2, p.334-336, Feb.

SCHLAGER, A et al (2000). Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between in the healing of wavelength (635 nm and 690 nm) and a placebo group. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.27, n.1, p.39-42, July.

SCHLAGER, A. et al. (2000). Healing of burns after treatment with 670-nanometer low-power laser light. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Baltimore, v.105, p.1635-1639.

SENNEVILLE, E. (2005). Antimicrobial interventions for the management of diabetic foot infections. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, London, v.6, n.2, p.263-273.

SILVERTHORN, D.V. et al. (2003). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. São Paulo: Manole.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A.D.; DEPOLO, A. (2000). Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.18, n.2, p.67-73.

SIMUNOVIC, Z.; TROBONJACA, T. (2000). *Lasers in medicine and dentistry – basic science and up-to-date clinical application of low energy – level laser therapy*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. p.19-21.

SMELTZER, S.C.; BARE, B.G. (Ed.). (1998). *Brunner & Suddarth: tratado de enfermagem médico-cirúrgica*. Tradução de Catarina Salvador da Motta. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. V.1

SNYDER-MACKLER, L.; SEITZ, L. (1990). Therapeutic uses of light in rehabilitation. In: MICHLOVITZ, S.L. *Thermal agents in rehabilitation*. 2.ed. Philadelphia: F.A.Davis, p. 300.

SOMMER, A.P. et al. (2001). Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.19, n.1, p.29-33.

STADLER, I. et al. (2000). In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.27, n.3, p.255-261, Sept.

STARKEY, C. (2001). *Recursos terapêuticos em fisioterapia*. Barueri: Manole, p. 404.

SURINCHAK, J.S. (1983). Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.2, n.3, p.267-274.

TACHIHARA, R.; FARINELLI, W.A.; ROX, A.R. (2002). Low-intensity light-induced vasodilation in vivo. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.30, Supl.14, p.11, Mar.

TAM, G. (1999). Low power laser therapy and analgesic action. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.17, n.1, p.29-33.

TANAKA, C. et al. (1996). Análise morfométrica do reparo de ulcerações de pele de origem venosa após tratamento de fisioterapia. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.3, p.47-53.

TAYLOR, D.L. et al. (1997). Comparison of a high power diode laser with the Nd: YAG laser using in situ wound strength analysis of healing cutaneous incisions. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.21, n.3, p.248-254.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. (1992). Mast cells are implicated in low power laser effect on tissue: a preliminary study. *Lasers in Medical Science*, London, v.7, p.73-77.

TUNÉR, J; HODE, L. (2002). *Laser Therapy: Clinical Practise and Scientific Brackground*. Estonia: Tallinn; UP Print. p. 571.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. (2003). Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.21, n.5, p.271-277.

VACCA, R.A. et al. (1993). Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, New York, v.195, n.2, p.704-709, Sept.

VINK, E.M. et al. (2003). Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in Medical Science*, London, v.18, n.2, p.95-99, May.

VIRAG, L.; SZABO, E.; BAKOND, E. (2002). Nitric oxide-peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Experimental Dermatology*, Copenhagen, v.11, n.3, p.189-202, June.

WALKER, H.T. et al. (2000). Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.26, n.1, p.41-47, Jan.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology*, New York, v.30, n.1, p.23-38, July.

WEISS, N.; ORON, U. (1992). Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embryology*, Berlin, v.186, p.497-503.

WEISS, R.A. et al. (2005). Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: clinical, histologic, and surface profilometric results. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.36, p.85-91.

WHELAN, H.T. et al. (2003). Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.21, n.2, p.67-74

WHELAN, H.T. et al. (2002). NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.20, n.6, p.319-324.

WHELAN, H.T. et al. (2001). Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.19, n.6, p.305-314

WONG-RILEY, M.T. et al. (2001). Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*, v.12, n. 148, p. 3033-3037, October.

WOODRUFF, L.D. et al. (2004). The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont, v.22, n.3 p.241-247.

YAAKOBI, T. et al. (2001). Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion in the rat heart. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.90, n.6, p.2411-2419, June.

YI, J.Y. et al. (2001). Reconstruction of basement membrane in skin equivalent; role of laminin-1. *Archives of Dermatological Research*, Heidelberg, v.293, n.7, p.356-362, July.

YOUNG, S. et al. (1989). Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.9, p.497-505.

YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAME, R.J. (1997). Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.20, n.1, p.56-63, Dec.

ZHAO, X.B. et al. (2002). Synthesis and characterization of a novel double crosslinked hyaluronan hydrogel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, London, v.13, n.1, p.11-16 Jan.

ZORZETO, N.L. (1995). *Curso de anatomia humana*. 6.ed. Presidente Prudente: Data Júris.

8. ANEXO

Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 070/2004, sobre o projeto intitulado *“Estudo comparativo entre a biomodulação LED e laserterapia de baixa intensidade no espectro vermelho em feridas cutâneas de ratos”*, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de março de 2005**.

(We certify that the protocol nº 070/2004, about *“Comparative study between the biomodulation LED and lasertherapy of low intensity in the red spectrum in skin wounds of rats”* agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **03/28/2005** meeting.).

Ribeirão Preto, 28 de março de 2005.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Vice-Presidente, em exercício, da Comissão de
Ética em Experimentação Animal