

Terapia a laser de baixa potência e sua eficácia na cicatrização de incisões cirúrgicas na pele de ratos

Effects of low laser power laser therapy in wound healing in rats

Klaus Rodrigues de Oliveira¹, Guilherme Barbosa Moreira², Samuel Electo de Almeida³, Rafael Paolinelli de Carvalho³, Renato Tavares Esteves³, Lívia Neffa³, Talita Rodrigues de Oliveira⁴, Juliana Electo de Almeida⁵, Sérgio Ibañez Nunes⁶, Valéria de Melo Rodrigues Oliveira⁷

RESUMO

¹ Acadêmico do 6º ano de Medicina da FAME-Barbacena-MG, cirurgião-dentista
² Acadêmico do 6º ano de Medicina da FAME-Barbacena-MG, fisioterapeuta
³ Acadêmicos do 6º ano de Medicina da FAME-Barbacena-MG
⁴ Acadêmica do 2º ano de Medicina da FCMMG
⁵ Cirurgião-dentista
⁶ Doutor e Professor da FAME-Barbacena-MG
⁷ Doutora e Professora da FCMMG, Pediatra e Epidemiologista do HJJP/II / FHEMIG

A terapia com laser de baixa potencia se tornou algo de inúmeras pesquisas, devido a melhora do processo cicatricial. Um estudo experimental foi realizado para avaliar se há benefícios dessa terapia na cicatrização de feridas na pele de ratos com análises não pareadas e pareadas. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* divididos em 4 grupos, submetidos a 4 incisões lineares na pele do dorso. No Grupo 1, usamos uma dose de laser no pós-operatório; no Grupo 2, duas doses, uma no pós-operatório e após 24 horas; no Grupo 3, três doses, no pós-operatório, 24 e 48 horas. O grupo controle foi submetido às incisões da pele. Foram testadas a força de ruptura e analisados os achados histopatológicos das incisões. Em análise não pareada, o grupo 1 apresenta o maior valor, tendo diferença ($p = 0,040$). A força de ruptura dos quatro grupos de ratos para as feridas não tratadas, não ocorreu. Na análise pareada as feridas tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e grupo controle, não houve diferença. Em análise não pareada, segundo a epitelização e a granulação, o grupo 3 apresentou maior frequência para epitelização ($p=0,002$) e granulação ($p=0,012$). Nas feridas não tratadas nos quatro grupos não houve diferença entre elas em relação à epitelização e à granulação. Na análise pareada, não ocorreram diferenças dessas para os ferimentos produzidos nos grupos. É improvável existir relação entre a terapia a laser e a cicatrização, sendo a associação na análise não pareada apenas aparente, justificada pelo método de avaliação.

Palavras-chave: cicatrização de pele, laser de baixa potência.

ABSTRACT

Low power laser therapy is recently in focus due to its properties in angiogenesis, fibroblast and collagenase activity. Based on these facts, the benefits of low laser power therapy in wound healing have been considered. In order to evaluate the benefits of low power therapy in wound healing, twenty Wistar rats were divided into four groups (n=5) which received four linear incisions in the back and then the following treatments, 1: a post-incision laser dose 2: one post-incision and 24 hours later dose 3: one post-incision, 24 and 48 hours later laser doses. 4: control group, with the four skin incisions and no laser therapy. Rupture force and histopathological analyses were performed. Unpaired analyses showed that epithelialization ($p=0.002$) and granulation ($p=0.012$) were more frequent. But there were no differences between groups, using paired analyses. Thus, it is not likely that there is a correlation between low power laser treatment and wound healing. Our findings using unpaired analyses can be justified by the findings using unpaired analyses can be justified by the method of analyses.

Key words: wound healing, low level laser therapy.

Instituição:
 Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais e
 Faculdade de Medicina de Barbacena

Endereço para correspondência:
 Rua Gonçalves Dias 1041, ap 101
 Belo Horizonte, MG
 CEP: 30140-091
 E-mail: klacx@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As radiações do tipo laser de baixa potência, com espectros de ondas eletromagnéticas situadas nas faixas entre 690 a 940 nm, tornaram-se objeto de inúmeras pesquisas científicas, enfocando em especial, a sua ação angiogênica, incremento da atividade fibroblástica e colagenogênese, beneficiando, portanto, a cicatrização¹.

Os efeitos terapêuticos do laser sobre os diferentes tecidos biológicos são muito amplos, incluindo efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos. Tais efeitos são demonstrados em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando-se a proliferação de células epiteliais e fibroblásticas, o aumento da microcirculação local, assim como o aumento na síntese de colágeno^{1,2,3}. Efeitos à distância, fora do local de aplicação, também são descritos quando utilizada a terapia^{1,4,5}.

Apesar da maioria dos estudos demonstrar que a utilização do laser de baixa potência é positiva para o processo de cicatrização de tecidos moles^{1,2,3}, incluindo aspectos histológicos e biomecânicos como o aumento de força de tensão dos ferimentos^{6,7}, e para a diminuição dos sintomas dolorosos advindos de procedimentos clínicos e/ou cirúrgicos^{1,2,3}, há relatos na literatura da ausência destes benefícios^{6,7,8,9}.

Esses dados conflitantes resultam em dúvidas plausíveis sobre as variações nos métodos de tratamento e limitações dos projetos experimentais⁷. Não existem parâmetros considerados ideais para obtenção dos benefícios na aplicação da terapia a laser, o que dificulta a determinação e compreensão de seus efeitos⁷.

Este estudo pretende avaliar a existência de benefícios da terapia a laser de baixa potência no processo cicatricial de feridas na pele de ratos, sugerir o número de aplicações necessárias para potencializar a cicatrização, assim como, avaliar um possível efeito a distância do local de aplicação da terapia.

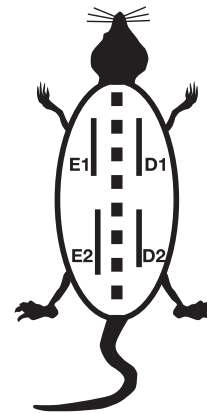
MÉTODOS

O presente estudo foi um experimento de laboratório com cobaias e grupo controle. Foram utilizados 20 animais para investigar a relação entre terapia a laser de baixa potência e o processo cicatricial de incisões cirúrgicas na pele de ratos, avaliando a força de ruptura e os achados histopatológicos. Os animais eram ratos, da raça *Wistar Albinus*, todos fêmeas,

com peso entre 122 a 200 gramas e aproximadamente 100 dias de idade, selecionados casualmente entre os existentes no biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena, em 2009..

Todos animais foram submetidos a quatro incisões lineares no sentido longitudinal na pele (epiderme, derme e plano subcutâneo) do dorso, sendo duas do lado esquerdo e duas do lado direito. Todas as incisões foram feitas sobre duas linhas paralelas à coluna vertebral, sendo essas linhas dispostas a 1 cm da coluna em cada lado do animal. Sobre cada linha foram feitas duas incisões medindo cada uma 3 cm, dispostas no sentido crânio-caudal e separadas entre si por 2 cm de pele íntegra. (Figura 1). Todas as incisões, após abertas, foram suturadas por 3 pontos simples com fio de nylon 5/0.

Lado Esquerdo Lado Direita



E1 - incisão cranial esquerda
E2 - incisão caudal esquerda
D1 - incisão cranial direita
D2 - incisão caudal direita

Figura 1 - Representação gráfica das incisões cirúrgicas no dorso do rato.

Para realização do estudo, os ratos foram igualmente divididos em 4 grupos: Grupo1 (G1), Grupo2 (G2), Grupo3 (G3) e Grupo Controle (GC). No G1, os animais foram submetidos à aplicação do laser no pós-operatório imediato e não mais receberam tratamento até o fim do experimento. No G2, os animais receberam a aplicação do laser também no pós-operatório imediato e após 24 horas de pós-operatório. Já no G3, os animais foram tratados como os do G2 além de uma aplicação de laser após a 48ª hora de pós-operatório, totalizando 3 aplicações e os ratos do GC foram submetidos exclusivamente às incisões da pele, não recebendo nenhuma aplicação de laser em nenhum dos ferimentos.

A terapia a laser foi realizada somente nas feridas cirúrgicas do lado esquerdo, cranial e caudal, nos animais dos três grupos de tratamento (G1, G2 e G3). Todos os animais receberam em cada aplicação a mesma dosagem variando apenas o número de aplicações.

Foi utilizado aparelho de laser de diodo de baixa potência, AsAlGa (Three Light Plus da empresa Clean Line, registro 80210180006 – ANVISA), com a seguinte modulação: laser de emissão infravermelho contínua; comprimento de onda de 795 nm; potência 120 mW, e dose de 4 J/cm², sendo essa modulação sugerida pela literatura científica^{1,2,3,10,11,12}. O tempo de aplicação é programado pelo próprio aparelho a partir da modulação estabelecida pelo operador. Durante a aplicação do laser foi colocado um dispositivo de isolamento sobre as feridas não irradiadas com a intenção de que a aplicação fosse exclusiva à uma única incisão. Tal dispositivo foi constituído por um material impermeável à luz no espectro visível.

A aplicação do laser foi feita em todos os animais dos grupos experimentais e em todas as ocasiões propostas anteriormente. As feridas tratadas foram divididas em 5 pontos imaginários de 6 mm cada. Cada um desses pontos recebeu a terapia a laser de forma pontual por 33 segundos/ponto, de tal forma que, o tempo de tratamento de cada ferida foi de 165 segundos, compreendendo toda sua extensão de forma homogênea.

Os animais foram mortos no quarto dia de pós-operatório com doses tóxicas de cetamina a 10% por via intraperitoneal, sucedendo-se a retirada de fragmentos de pele do dorso e posterior realização do teste de força de ruptura e estudo histopatológico das incisões. Nesse processo, inicialmente foi aplicada dose analgésica e posteriormente dose letal para coleta de fragmentos da pele por biópsia excisional.

As duas incisões craniais de ambos os lados foram utilizadas para teste de força de ruptura e as caudais para testes histopatológicos. As incisões craniais foram biopsiadas com margens de 3,0 cm (comprimento) x 2,0 cm (largura) x 0,3 cm (profundidade) para avaliação da força de ruptura. Para esta análise foi utilizado um aparelho idealizado e construído pelos pesquisadores, baseado em um instrumento produzido e utilizado em trabalho prévio¹³. A aparelhagem (figura 2) é composta por uma base de madeira que contém uma extremidade fixa e uma móvel, sendo que ambas possuem uma pinça do tipo De Martel que fixa as bordas do tecido excisionado. Acoplado à pinça móvel, através de uma roldana, existe uma bolsa coletora de líquidos, e à medida que essa é pre-

enchida por água acaba por provocar o afastamento das extremidades do fragmento gerando tensão e conseqüente ruptura da incisão cirúrgica cicatrizada. A partir daí, o volume do líquido que provocou a ruptura é mensurado em gramas, obtendo assim, o peso correspondente à força de adesão.



Figura 2 - Aparelhagem de aferição da força de ruptura. Vista panorâmica (A); vista lateral (B); e vista superior (C) da aparelhagem.

A análise histopatológica foi feita em fragmentos retirados das incisões caudais que também sofreram biópsias excisionais da mesma forma das incisões craniais, no mesmo momento. As amostras foram colocadas em formalina tamponada à 10% e identificadas. O material retirado foi processado, incluído em parafina, realizados cortes de 4 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, para posterior análise à microscopia óptica de luz (MO). Esses fragmentos biopsiados foram avaliados pelos autores da pesquisa em uma análise subjetiva e comparativa em relação a um escore de cruces adaptado¹⁴. Para análise e comparação histopatológica foram avaliados a epitelização, a reação inflamatória, a existência de tecido de granulação e de fibrose, como descrito na tabela 1.

A análise dos dados foi realizada em microcomputadores com recursos de processamento estatístico no software STATA 9.2. Foram construídas distribuições de frequência e calculadas as médias e desvios padrões para cada variável. O efeito do tratamento foi testado em tabela de contingência tipo RxC e em tabelas de ANOVA ONE WAY. A aferição do significado estatístico das comparações foi realizada através do Teste de Quiquadrado no caso de comparação de percentagens, ou do Teste de Fisher

para tabelas de ANOVA no caso de comparação de médias. O Teste de Kruskal Wallis foi utilizado na comparação de grupos que não puderam ser comparados com o Teste de Fisher.

Tabela 1 - Escore para análise histopatológica

Epitelização	
+	Presença de espessa crosta fibrinoleucocitária sobre a ferida à MO no aumento de 10x; delgada epitelização com a presença de apenas uma camada (camada basal) à MO no aumento de 40x
++	Presença de delgada crosta fibrinoleucocitária sobre a ferida à MO no aumento de 10x; espessa epitelização com a presença de mais de uma camada na epiderme com pouca organização das mesmas à MO no aumento de 40x
+++	Rara presença de crosta fibrinoleucocitária sobre a ferida à MO no aumento de 10x; epitelização completa com epiderme espessa e camadas organizadas à MO no aumento de 40x.
Reação Inflamatória	
+	Acentuada, quando existiu infiltração de células inflamatórias visível ao pequeno aumento do MO (10x)
++	Discreta, quando foi preciso aumentos maiores que o aumento de 10x no MO para identificação da infiltração de células inflamatórias
Tecido de Granulação	
+	Quando se observou a presença de neovasos a MO no aumento de 10x e contados até 7 vasos por campo no aumento de 40x
++	Quando se observou a presença de neovasos a MO no aumento de 10x e contados mais de 7 vasos por campo no aumento de 40x
Fibrose	
+	Ausente, quando não foram observados depósitos de fibras colágenas nos vários aumentos do MO
++	Presentes, quando foram observados depósitos de fibras colágenas nos vários aumentos do MO

Foram feitas dois tipos de análises, não pareada e pareada. A análise não pareada foi realizada com a comparação das freqüências e das médias das medidas originais feitas nos ferimentos sem qualquer modificação. A análise pareada foi realizada com as diferenças das medidas feitas nos ferimentos do lado direito e esquerdo de cada animal. Na avaliação da epitelização, reação inflamatória, granulação e fibrose, cada animal foi caracterizado como portador de variação positiva do resultado de um ferimento quando comparado com o outro e portador de variação negativa quando ambos os ferimentos apresentaram o mesmo resultado da avaliação histopatológica. O grau de significância estatística adotado na análise foi de 5 %.

Os animais foram identificados por números de 1 a 5 em cada grupo, alocados em gaiolas contendo 5 animais e mantidos em armários climatizados. Os animais receberam alimentação à base de ração e água, sem restrições.

Todos os procedimentos com os animais foram registrados e procurou-se diminuir o tempo de manipulação das lesões. Pretendeu-se ainda induzir a inconsciência nos animais, o mais rápido possível, para o momento da morte, objetivando-se assim reduzir o sofrimento dos mesmos.

O presente estudo seguiu as normas de pesquisa em animais e os princípios éticos na experimentação, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), como também as resoluções sobre pesquisa animal definidas pela convenção de Helsinki (1995) e sua revisão na Escócia 2000. Seguiu também as resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A proposta do presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UNIPAC através do protocolo 367/8, aprovado em dezembro de 2008.

RESULTADOS

Relatam-se os resultados de um experimento de laboratório com ratos e grupo controle, realizado para investigar a relação entre terapia a laser de baixa potência e o processo cicatricial de incisões cirúrgicas na pele de ratos, avaliando a força de ruptura e os achados histopatológicos.

No texto e tabelas abaixo, E1, representa a cicatriz cranial do lado esquerdo e E2, representa a cicatriz caudal também do lado esquerdo sendo que ambas receberam terapia a laser. A cicatriz do lado direito cranial foi representada por D1 e a cicatriz caudal também do lado direito foi representada por D2, lembrando que ambas não receberam terapia a laser (Figura 1).

Durante o procedimento cirúrgico não foi observada nenhuma intercorrência que prejudicasse o processo cicatricial por primeira intenção, como a presença de sangramento ativo importante e a presença de deiscências nas suturas. Já no pós-operatório foram documentadas perdas de pontos cirúrgicos de algumas suturas e conseqüente presença de deiscências nas seguintes feridas: D1 do rato 2 e D2 do rato 5, ambos do G2; feridas D2 dos ratos 2 e 4 e D1 do rato 5, todos do G3; e feridas D2 dos ratos 2 e 5, pertencentes ao GC. Não foram observados sinais de seroma, hematoma e infecção.

O melhor detalhamento das características dos animais é apresentado na tabela 2, onde são apresentadas as distribuições de freqüência das características dos animais presentes em cada grupo do estudo, representadas pelo peso, força de ruptura das cicatrizes e resultados do exame histopatológico dos ferimentos, discriminados pelos grupos. Na

tabela é também apresentado o valor de p encontrado no Teste Exato de Fisher aplicado na aferição do significado estatístico das diferenças entre os percentuais.

Na tabela 3 são apresentadas as distribuições de freqüência das diferenças observadas entre as medidas realizadas nas cicatrizes do lado esquerdo e

Tabela 2 - Distribuição de freqüência das características dos ratos e resultados das medidas efetuadas no experimento, discriminadas pelos grupos de animais tratados e controle.

Características	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo C		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Peso (g)									
120 – 180	1	20,0	4	80,0	3	60,0	2	40,0	0,459
181 – 200	4	80,0	1	20,0	2	40,0	3	60,0	
Força de ruptura das feridas tratadas e grupo controle - E1 - (Newtons)									
1,3 - 3,6	1	20,0	4	80,0	2	40,0	4	80,0	0,226
3,6 – 6,4	4	80,0	1	20,0	3	60,0	1	20,0	
Força de ruptura das feridas não tratadas e grupo controle – D2 - (Newtons)									
0,99 – 3,7	2	40,0	1	20,0	3	60,0	4	80,0	0,459
3,71 – 8,4	3	60,0	4	80,0	2	40,0	1	20,0	
Epitelização das feridas tratadas e grupo controle – E1 -									
+	1	20,0	0	00,0	0	00,0	4	80,0	0,002
++	4	80,0	4	80,0	1	20,0	1	20,0	
+++	0	00,0	1	20,0	4	80,0	0	00,0	
Epitelização das feridas não tratadas e grupo controle - D2 -									
+	3	60,0	2	40,0	1	20,0	3	60,0	0,805
++	2	40,0	3	60,0	3	60,0	2	40,0	
+++	0	00,0	0	00,0	1	20,0	0	00,0	
Reação Inflamatória das feridas tratadas e grupo controle - E1 -									
+	5	100,0	5	100,0	5	100	5	100,0	--
++	0	00,0	0	00,0	0	00,0	0	00,0	
Reação Inflamatória das feridas não tratadas e grupo controle – D2 -									
+	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	--
++	0	00,0	0	00,0	0	00,0	0	00,0	
Granulação das feridas tratadas e grupo controle - E2 -									
+	4	80,0	3	60,0	0	00,0	5	100,0	0,012
++	1	20,0	2	40,0	5	100,0	0	00,0	
Granulação das feridas não tratadas e grupo controle – D2 -									
+	5	100,0	4	80,0	2	40,0	5	100,0	0,128
++	0	00,0	1	20,0	3	60,0	0	00,0	
Fibrose das feridas tratadas e grupo controle – E2 -									
+	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	--
++	0	00,0	0	00,0	0	00,0	0	00,0	
Fibrose das feridas não tratadas e grupo controle – D2 -									
+	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	--
++	0	00,0	0	00,0	0	00,0	0	00,0	

direito de cada animal, em cada um dos grupos. São apresentados também os resultados do Teste Exato de Fisher (p), aplicados na comparação dos percentuais exibidos na tabela.

Na tabela 4 são apresentadas as médias e desvios-padrões do peso dos animais e da força de ruptura mensurada nas cicatrizes nos diferentes grupos. São apresentados também os resultados do Teste Exato de Fisher (F), para as tabelas de ANOVA, e Kruskal-Wallis (Kw), com os respectivos valores de p correspondentes.

Tabela 4: Médias e desvios padrões do pesos, forças de ruptura e diferenças da forças de ruptura registradas para os animais dos 4 grupos do experimento.

DISCUSSÃO

A aplicação do laser na área médica teve um crescimento significativo nas últimas décadas, sendo utilizada para fins cirúrgicos e terapêuticos. Dentre as inúmeras descobertas notáveis em todas as áreas de crescimento, o laser tem ocupado posição de destaque¹². A terapia a laser de baixa potência é método aceito pela Food and Drug Administration (FDA) como tratamento clínico eficaz na cicatrização de tecidos^{15,16}.

O comprimento de onda do laser que determina sua utilização para fins terapêuticos e que o caracteriza como sendo de baixa potência está localizado

Tabela 3 - Distribuição de freqüência das diferenças da força de ruptura, da epitelização e da granulação obtidas das cicatrizes do lado esquerdo e direito de cada animal por grupo e indicativos de variação positiva ou negativa dos elementos encontrados nas duas cicatrizes na pesquisa de força de ruptura, epitelização e granulação dos animais dos 4 grupos experimentais.

Característica	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo C		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Força de ruptura (Newtons)									
0 – 30	2	40,0	2	40,0	3	60,0	3	60,0	1,000
40 – 0 (-)	3	60,0	3	60,0	2	40,0	2	40,0	
Epitelização									
Positivo	2	40,0	3	60,0	3	60,0	1	20,0	0,762
Negativo	3	60,0	2	40,0	2	40,0	4	80,0	
Granulação									
Positivo	1	20,0	1	20,0	2	40,0	0	0,0	0,871
Negativo	4	80,0	4	80,0	3	60,0	5	100,0	

Tabela 4 - Médias e desvios padrões do pesos, forças de ruptura e diferenças da forças de ruptura registradas para os animais dos 4 grupos do experimento.

Característica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo C	F/Kw	p
Peso (g)						
Média	184,4	169,6	179,6	169,2	5,49	0,139
Desvio padrão	6,6	10,7	14,9	29,0		
Força de ruptura das feridas tratadas e grupo controle - E1 - (Newtons)						
Média	4,9	3,0	4,3	3,1	3,50	0,040
Desvio padrão	1,1	1,3	1,2	0,6		
Força de ruptura das feridas não tratadas e grupo controle - D2 - (Newtons)						
Média	5,6	3,9	3,8	3,2	1,95	0,163
Média	2,2	1,8	1,1	0,7		
Diferença da força de ruptura						
Média	-0,6	-0,9	-0,4	-0,1	0,64	0,600
Desvio padrão	1,9	1,8	1,9	0,4		

entre 600 e 1000 nm¹². Nesta faixa obtém-se um poder de penetração em torno de 1,4 mm o que justifica seu uso em diferentes tecidos para o reparo cicatricial, incluindo o tecido cutâneo, onde se observa um número expressivo de pesquisas¹.

O laser de baixa potência com densidade de energia na faixa de 3 a 6 J/cm² é considerado adequado por possuir melhores efeitos cicatrizantes, reparativos e regenerativos em diversos tecidos, tanto em humanos quanto em animais^{1,2,3,10,11,12}. Valores inferiores ou superiores de dosagem ao intervalo citado anteriormente, não demonstraram resultados satisfatórios, sendo que doses mais altas demonstraram inibição da biomodulação celular e doses mais baixas não demonstraram ação efetiva no processo cicatricial¹².

Considerando tais aspectos, foi definido para o estudo pela utilização de um aparelho laser diodo de baixa potência com fonte de emissão AsAlGa com a seguinte modulação: laser de emissão infravermelho contínua; comprimento de onda de 795 nm; potência 120 mW, e dose de 4 J/cm².

Em relação à frequência de aplicação do laser existem variações^{4,11,12,17,18}. Vários esquemas posológicos já foram testados, como por exemplo; 3 aplicações, sendo essas realizadas no pós operatório imediato, 24 horas e 7 dias após¹¹; aplicações diárias por 3 dias consecutivos¹⁷; e apenas uma única aplicação^{4,12,18}. Essas entre outras pesquisas sugerem que apenas uma aplicação não seria suficiente para alcançar algum efeito celular benéfico, e que um maior número de aplicações é necessário para atingir tal benefício^{4,8,11,12,17,18}.

A terapia a laser de baixa potência possui efeitos fisiológicos que são divididos em primários (diretos), secundários (indiretos) e terapêuticos. Entre os efeitos primários merecem destaque os bioquímicos (liberação de histamina, serotonina e bradicinina, produção de ATP, inibição de prostaglandinas e lise de fibrina), bioelétrico (potencialização da bomba de sódio/potássio) e bioenergéticos (normalização do contingente energético e físico de cada indivíduo). Dentre os secundários enfatizam-se o estímulo à microcirculação com conseqüente fluxo sanguíneo aumentado, e o estímulo ao trofismo celular, aumentando a velocidade de cicatrização e otimizando o trofismo tecidual. Como efeitos terapêuticos são sugeridos o analgésico, antiinflamatório, antiedematoso e cicatricial¹.

Dentre os efeitos terapêuticos propostos pelo laser, a cicatrização tem uma posição de destaque, sugerindo-se que seus efeitos devam-se ao incremento

à produção de ATP, que proporcionaria um aumento da atividade mitótica e a síntese protéica, tendo como conseqüência o aumento da regeneração tecidual no processo de reparação; o estímulo à microcirculação e a formação de novos vasos a partir dos preexistentes, sendo que estes aumentariam o aporte nutricional e a velocidade mitótica; e por fim a estimulação da matriz colagenosa¹.

Entretanto, há relatos da ausência de benefícios no processo cicatricial mediante o tratamento com o laser de baixa potência^{8,9}. Em estudo de revisão de literatura sobre os efeitos do laser de baixa potência no processo de cicatrização, há relatos que houve uma discordância em relação aos resultados obtidos com o uso da terapia^{6,7}. Esses dados conflitantes resultam em dúvidas plausíveis quanto às variações nos fatores de tratamento e limitações em projetos experimentais⁷.

Os benefícios da terapia a laser no processo cicatricial baseiam-se em sua maioria em experimentos que utilizam comparações entre feridas de grupos experimentais com o grupo controle^{1,2,3,10,11,12}. Há poucos relatos de estudos com comparação pareada, em que a lesão tratada e a não tratada (lesão controle) encontram-se no mesmo animal, o que reduziria as influências individuais dos animais, caso estas sejam relevantes no processo cicatricial¹⁹.

No presente estudo ao analisar a frequência dos pesos dos animais nos quatro grupos, observa-se que não houve diferenças significativas entre eles, ou seja, estas medidas são comparáveis, de forma que o peso não deve interferir com os resultados do experimento. Essa característica dos animais pode ter sido eliminada durante a alocação aleatória dos ratos em seus respectivos grupos, não sendo encontrado na literatura científica referências que relacionam a influência do peso e processo cicatricial com a terapia a laser.

Na comparação, entre os grupos, da frequência da força de ruptura das feridas à esquerda, tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e não tratadas no grupo controle, constatou-se que a maior frequência dos maiores valores de força de ruptura foram obtidos no grupo 1, os menores valores foram encontrados nos grupos 2 e grupo controle e valores intermediários foram observados no grupo 3. A diferença entre os quatro grupos não é significativa ($p = 0,226$). No entanto, ao se comparar as médias da força de ruptura das feridas tratadas e do grupo controle, observa-se que o grupo 1 apresenta o maior valor, tendo diferença significativa ($p = 0,040$). Esse resultado sugere que

o menor número de aplicações promove aumento na força de ruptura das feridas quando analisadas no 4º dia de pós-operatório.

As frequências da força de ruptura dos quatro grupos de ratos para as feridas à direita, não tratadas com terapia a Laser em todos os grupos, quando comparadas, não foi possível detectar diferença significativa ($p = 0,459$), sendo que o grupo que apresentou a maior frequência dos maiores valores foi o grupo 2 e maior frequência dos menores valores foi o grupo controle. Na comparação das médias das forças de ruptura também dos ferimentos à direita, nota-se que a maior média foi evidenciada no grupo 1 e a menor média no grupo controle. Essa comparação não apresenta diferença significativa ($p = 0,163$). Esses resultados sugerem não haver efeito à distância do local de aplicação do Laser, concordando com o resultado obtido na comparação das feridas do lado esquerdo e reforçando a idéia de que existe uma aparente associação entre a terapia a laser puntual e a força de ruptura.

Há incremento da força de ruptura após utilizar terapia a laser de baixa potência na densidade de 2 ou 4J/cm², quando analisa-se feridas da pele de ratos no 7º dia de pós-operatório²⁰, concordando com os achados acima descritos. Entretanto, não foi encontrado diferença na força de ruptura de fragmentos de pele entre ratos irradiados e não irradiados quando utilizada terapia a laser de baixa potência⁹. Vale ressaltar que estes trabalhos basearam-se em comparações não pareadas.

A fim de se obter um adequado efeito local, recomenda-se que durante a irradiação a caneta do aparelho deva ser posicionada a um ângulo de 90º e estar em contato direto com o sítio da lesão, diminuindo assim, o índice de dispersão das ondas eletromagnéticas¹. No entanto, há evidências da possibilidade de surgirem efeitos à distância, parecendo não haver a necessidade de irradiação direta da lesão ou tecido alvo para conseguir-se a ação terapêutica do laser de baixa potência^{4,5}.

Na análise pareada, a comparação das frequências das diferenças da força de ruptura registradas dos ferimentos produzidos no mesmo animal, feridas tratadas com Laser e não tratadas nos grupos 1, 2, 3 e controle, não constatou diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos de animais ($p = 1,000$). Esse achado sugere, contrariamente à comparação não pareada, não haver relação entre a terapia a laser e o aumento da força de ruptura nas feridas. Esta hipótese é refor-

çada quando se analisa a média das diferenças das forças de ruptura registradas para os animais dos 4 grupos do experimento, ao observar que a mesma não foi estatisticamente significativa ($p = 0,600$).

Na literatura científica não foi possível encontrar estudos que realizam análises pareadas comparando terapia a laser e força de ruptura no 4º dia de pós-operatório. Entretanto, em estudo pareado, foi encontrado ao final de 21 dias, aumento significativo da força de ruptura entre feridas tratadas com laser em relação à feridas não tratadas, em um experimento que avaliou a influência da terapia a laser de baixa potência na cicatrização de ferimentos cirúrgicos em ratos diabéticos²¹.

O confronto dos resultados obtidos com os diferentes métodos de comparação sugere ser improvável existir relação entre a força de ruptura e a cicatrização, e que, a associação encontrada na análise não pareada é apenas aparente, sendo justificada mais pelo método de avaliação do que uma real associação física-biológica entre a terapia a laser e a cicatrização.

O método utilizado para análise da força de ruptura mostrou-se apropriado e eficaz, uma vez que minimizou possíveis *bias* de aferição, apesar de ser um instrumento artesanal e inédito criado pelos próprios pesquisadores.

Na análise dos resultados a comparação da frequência dos quatro grupos de ratos segundo a epitelização das feridas à esquerda, tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e não tratadas no grupo controle, observou-se que o grupo com maior número de aplicações da terapia a laser, grupo 3, é o que apresenta índices de epitelização mais intensa com maior frequência, enquanto que no grupo controle observou-se uma maior frequência de epitelização com menor intensidade. Índices intermediários de epitelização foram notados nos grupos que receberam uma ou duas aplicações. A diferença entre os 4 grupos é significativa ($p = 0,002$), sugerindo aparentemente que um maior número de aplicações de terapia a laser pode estimular uma maior intensidade de epitelização.

Na comparação das frequências de intensidade de epitelização nos ferimentos à direita, não tratados com terapia a laser, apresentados pelos grupos do experimento, não foi possível detectar diferença significativa ($p = 0,805$) entre eles, apesar das feridas à direita do grupo controle apresentarem mais frequentemente menor índice de epitelização, em com-

paração com os grupos que receberam duas ou três aplicações na ferida contralateral. Essa análise sugere não haver efeito à distância do local de aplicação do laser. Esse resultado concorda com o resultado obtido na comparação das feridas do lado esquerdo e reforça a idéia de que existe uma aparente associação entre a laserterapia puntual e a epitelização.

Observou-se aumento da migração epitelial no 1º, 3º, e 7º dias de pós-operatório em trabalho que utilizou terapia a laser de baixa potência na dosagem de 4J/cm² em feridas cirúrgicas na pele de ratos²², assim como foi encontrada melhora da epitelização da ferida no 7º dia de pós-operatório ao utilizar laser de baixa potência, com 2 ou 4J/cm² de densidade²⁰. O oposto foi visto quando utilizou-se terapia a laser de baixa potência com diferentes potências, 3,8 J/cm², 4,0 J/cm² e 8,0 J/cm², para o tratamento de feridas cirúrgicas no dorso de ratos, não constatando-se diferenças no processo de epitelização quando comparadas com os grupos controles que não receberam tratamento com laser¹¹.

Mas deve ser notado que essa associação se baseia em comparação não pareada que não leva conta a possibilidade de se instituir dois tipos de tratamentos, irradiação e não irradiação, em dois ferimentos produzidos no mesmo animal.

Na comparação da frequência dos quatro grupos de ratos segundo a reação inflamatória das feridas à esquerda, tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e não tratadas no grupo controle, e das feridas à direita, que não receberam terapia a laser em todos dos grupos, notou-se que o índice de infiltrado inflamatório permaneceu idêntico para todas as feridas independentemente do grupo a que pertencia o rato. As diferenças observadas não foram significativas estatisticamente. A metodologia utilizada para quantificar as características histológicas da reação inflamatória parece não ter sido eficiente para a distinção dos graus de infiltrado inflamatório dos grupos.

Há relatos da utilização da terapia a laser de baixa potência em feridas cutâneas no dorso de ratos, constatando-se menor quantidade de células inflamatórias nos grupos que receberam o tratamento quando comparados com os grupos controles que não receberam^{20,22,23}. Contrariamente, em experimento que usou terapia a laser de baixa potência, também para o tratamento de feridas no dorso de ratos, foi detectado aumento das células inflamatórias nos

grupos irradiados quanto comparados com o grupo controle que não recebeu qualquer tratamento¹¹.

Na comparação da frequência dos 4 grupos de ratos segundo a granulação nas feridas à esquerda tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e não tratadas no grupo controle, observa-se que o índice de formação do tecido de granulação mais intenso ocorreu com maior frequência, em todos os animais do grupo que recebeu maior número de aplicações e o grupo que obteve a maior frequência da menor intensidade de granulação foi o grupo controle. Os grupos de animais que receberam uma ou duas aplicações apresentaram frequências variadas em relação aos índices de granulação, com frequências inferiores ao grupo com maior número de aplicações. Essa comparação apresenta diferença estatística ($p = 0,012$), sugerindo aqui também, que o maior número de aplicações da terapia a laser seja aparentemente benéfico no incremento do processo de granulação.

Para a granulação das feridas à direita, que não receberam terapia a laser em todos dos grupos, a comparação das frequências entre os quatro grupos não demonstrou diferenças significativas estatisticamente ($p = 0,128$), sugerindo não haver efeito à distância do local da aplicação. Os dados reforçam a idéia de que existe uma aparente associação entre a laserterapia puntual e a granulação, mas esses resultados são obtidos também na comparação não pareada dos quatro grupos de animais.

A maturidade e a proliferação vascular do tecido de granulação foi evidenciada em maior intensidade nas feridas cirúrgicas da pele de ratos tratados com terapia a laser de baixa potência em relação às feridas cirúrgicas não tratadas, em trabalhos que utilizaram metodologias de aplicação do laser semelhantes ao realizado no estudo com biópsias variando entre o 3º e 10º dia pós-operatório para a análise histopatológica^{11,12,22,23}. Entretanto, foi relatado ausência de benefícios da terapia a laser de baixa potência em relação à proliferação vascular no tecido de granulação nas análises histopatológicas realizadas do 2º ao 10º dia de pós-operatório⁸.

Vale lembrar que a associação da granulação com a terapia a laser de baixa potência até o presente momento foi realizada considerando-se apenas a análise não pareada dos resultados.

Ao se comparar a frequência da fibrose nos quatro grupos de ratos, tanto nas feridas à esquerda, tratadas com laser nos grupos 1, 2 e 3 e não tratadas no

grupo controle, quanto nas feridas à direita, que não receberam nenhuma aplicação da terapia a laser em todos os grupos, viu-se que o índice de fibrose permaneceu idêntico para todas as feridas, independentemente do grupo a que pertencia o rato, posto que, não houve diferenças significativas estatisticamente entre eles. A metodologia utilizada para quantificar as características histopatológicas da fibrose parece não ter sido eficiente para a distinção dos graus da mesma nos quatro grupos.

O reparo tecidual induzido pelo laser de baixa potência em incisões cirúrgicas em ratos no 7º dia de pós-operatório demonstrou aumento dos depósitos de fibras colágenas nos reparos cicatriciais submetidos ao tratamento em comparação com o grupo controle^{20,22}. Contudo não foi detectado aumento de fibras colágenas em ferimentos no dorso de ratos submetidos à terapia a laser de baixa potência entre o 3º e o 7º dias de pós-operatório quando comparados com animais não tratados¹².

Já a comparação pareada da epitelização entre os ferimentos produzidos no mesmo animal, feridas tratadas com laser e não tratadas nos grupos 1, 2 e 3 e controle, não evidenciou qualquer diferença estatisticamente significativa entre a frequência de intensidade de epitelização apresentada pelos 4 grupos de animais ($p = 0,761$). Esse resultado sugere, contrariamente a comparação não pareada, não haver qualquer relação entre a terapia a laser e a epitelização. O mesmo resultado se repete na comparação da granulação dos ferimentos quando se nota não haver diferença significativa entre as feridas tratadas e as não tratadas com laser ($p = 0,762$). Portanto, a análise pareada contraria os resultados sugeridos pela análise não pareada, trazendo a idéia de que não há relação entre a terapia a laser e a granulação, assim como visto na epitelização.

Houve dificuldade para a aquisição de estudos pareados que descrevem a influência da terapia a laser de baixa potência em estudos experimentais com animais por carência dos mesmos na literatura científica atual, principalmente avaliando características histopatológicas inerentes a cicatrização no 4º dia de pós-operatório aproximadamente. Entretanto, Damante¹⁹ ao realizar terapia a laser de baixa potência com dosagem de $4\text{J}/\text{cm}^2$ em tecido gengival após gengivoplastia para tratamento em humanos, observou, a partir de análise pareada de biópsias incisoriais do local no 7º dia de pós-operatório, que não houve diferença significativa quando analisadas, a epitelização e granulação dos fragmentos tratados a

laser com os não tratados. Já Reddy²¹, também em estudo pareado, investigou a influência do laser de baixa potência na cicatrização de feridas de ratos diabéticos e constatou que, após vinte e um dias de pós-operatório, houve um aumento significativo do número de fibras colágenas nas feridas tratadas quando essas eram comparadas com lesões não tratadas pertencentes ao mesmo animal.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os efeitos benéficos da terapia a laser no processo cicatricial não foram confirmados quando utilizado o modelo adequado de análise estatística para o experimento. A análise pareada é, no caso, a mais apropriada porque possibilita o controle de variações individuais nas características da cicatrização, levando em conta apenas os efeitos do tratamento a que os animais foram expostos, no caso a terapia a laser. A existência do grupo controle ainda permitiu uma comparação dos dois métodos de análise, demonstrando com maior fidelidade os resultados, não sendo necessária, portanto, a definição de número de aplicação ou existência de efeitos à distância. As discordâncias encontradas na literatura e a possível mitificação em relação aos efeitos benéficos da terapia a laser no processo cicatricial podem ser justificadas pela dificuldade de se encontrar estudos com comparação pareada. Estes devem ser mais estimulados para que as reais aplicações da terapia sejam elucidadas.

REFERÊNCIAS

1. Tavares MR. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. [dissertação]. Ribeirão Preto(SP):Universidade de São Paulo; 2002.
2. Tatarunas AC, Matera JM, Dagli MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). *Acta Cir Bras*. 1998;13(2):86-93.
3. Rocha JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *RBPS* 2004;17(1):44-8.
4. Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD, Forde DE, Overfield M, Bapna MS. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med*. 1989;9(1):50-8.
5. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter GD. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train*. 2004;39(3):223-29.

6. Bourguignon-Filho BMA, Feitosa RCA, Beltrão CG, Pagnocelli MR. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac.* 2005; 46(1):37-43.
7. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31:334-40.
8. Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988 Feb; 26(1):12-7.
9. Allendorf JD, Bessler M, Huang J, Kayton ML, Laird D, Nowygrod R, et al. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by wound contraction rate and tensile strength. *Lasers Surg Med.* 1997; 20:340-5.
10. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Z de A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17:307-13.
11. Rodrigues SSMFG. Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos de administração, no reparo de feridas cutâneas em ratos. [dissertação]. Taubaté, SP: Universidade de Taubaté; 2006.
12. Vieira SAL. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização das feridas cutâneas experimentais. [dissertação]. Franca: Universidade de Franca, Franca; 2006.