

# Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos

Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats

Viviane L. Busnardo<sup>1</sup>, Maria L. P. Biondo-Simões<sup>2</sup>

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do laser de baixa potência hélio e neônio (HeNe) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Métodos:** Sessenta ratos Wistar foram divididos em grupos controle e experimento. Utilizou-se ferida incisional, longitudinal, dorso-mediana, suturada com pontos separados simples. No grupo experimento, as feridas foram irradiadas diariamente com aparelho de laser de HeNe com potência contínua máxima de 5mW, comprimento de onda de 632,8 nm, visível com densidade de energia de 4J/cm<sup>2</sup>, área de raio do laser de 0,015cm<sup>2</sup>, durante 36 segundos, em três pontos da lesão. As feridas foram avaliadas no 3º, no 7º e no 14º dia de pós-operatório. Cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e avaliados segundo protocolo de Vizzotto et al. (2003)\* para identificar o tipo de reação inflamatória e com Picrosirius para identificar os colágenos I e III e o índice de maturidade da cicatriz (IMaC). Utilizou-se imunistoquímica com anti-CD45-LCA para o reconhecimento das células inflamatórias. **Resultados:** Ambos os grupos mostraram o mesmo padrão inflamatório. No grupo experimento, observaram-se menos células inflamatórias nos três tempos estudados (p<0,001), com diminuição mais rápida do número de leucócitos. Verificou-se que as do grupo experimento tinham maior densidade de colágeno total no 3º dia (p=0,001), com mais colágeno III (p=0,001) e mais colágeno I (p=0,001). Não houve diferença significativa no IMaC. **Conclusão:** A irradiação com laser de baixa intensidade não modifica a qualidade da reação inflamatória, mas diminui a intensidade dela; aumenta a deposição do colágeno no início do processo cicatricial e não interfere na maturação da cicatriz.

**Palavras-chave:** cicatrização de feridas; laserterapia de baixa intensidade; laser de gases Hélio e Neônio; colágeno.

\* Vizzotto Jr AO, Noronha L, Scheffel LHD, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. J Bras Patol Med Lab. 2003;39(2):143-9.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the effects of low-level helium-neon (HeNe) laser on cutaneous wound healing in rats. **Methods:** Sixty Wistar rats were divided into control group and experimental group. A sutured longitudinal, dorsal-medial incision was made, with simple separate stitches. The experimental group was irradiated daily in three areas of the wound with HeNe laser (5mW maximum continuous power, 632.8 nm wavelength, 4 J/cm<sup>2</sup> energy density and 0.015 cm<sup>2</sup> laser beam area) for 36 seconds. The areas were evaluated on the third, seventh and fourteenth days postoperative. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin to determine the type of inflammatory reaction according to the protocol by Vizzotto et al. (2003)\* and with Picrosirius to identify types I and III collagen and the collagen maturation index (CMI). Immunohistochemical detection was employed with anti-CD45-LCA to recognize the inflammatory cells. **Results:** Both groups had the same inflammatory pattern. The experimental group had fewer inflammatory cells at the three evaluation times (p<0.001) with faster reduction in the number of leukocytes. The experimental group had greater total collagen density on the third day (p=0.001), with more type III collagen (p=0.001) and more type I collagen (p=0.001). There was no significant difference in the CMI. **Conclusion:** Low-level laser irradiation does not change the quality of the inflammatory response, but it does reduce its intensity; it increases collagen deposition in the early stages of the healing process and does not interfere with collagen maturation.

**Key words:** wound healing; low-level laser therapy; helium-neon laser; collagen.

\* Vizzotto Jr AO, Noronha L, Scheffel LHD, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. J Bras Patol Med Lab. 2003;39(2):143-9.

Recebido: 21/08/2008 – Revisado: 10/02/2009 – Aceito: 30/06/2009

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba (PR), Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil

Correspondência para: Viviane L. Busnardo, Universidade Positivo, Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300, CEP 81280-330, Curitiba (PR), Brasil, e-mail: vivianelucci@up.edu.br

## Introdução ::::

O processo de cicatrização tecidual é muito complexo e envolve inúmeros efeitos biológicos, tais como alterações vasculares e celulares, proliferação epitelial, proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, produção de elastina e proteoglicanos, revascularização e contração da ferida<sup>1,2</sup>.

A incorporação do laser como instrumento terapêutico tem sido acompanhada na área biomédica desde 1960; porém, apesar de inúmeras pesquisas sobre seus efeitos, existe grande dificuldade em se justificarem as variáveis físicas como: técnica de aplicação, doses, profundidade, modos e tempo de exposição<sup>3</sup>.

Foi observado que a fotoestimulação influencia a função dos macrófagos na produção de fatores de crescimento, os quais aumentam a proliferação celular<sup>4-6</sup>.

Mester et al.<sup>7</sup>, em 1976, relatou que o laser hélio e neônio (HeNe) de baixa intensidade poderia ajudar na cicatrização de lesões causadas mecanicamente. Desde então, foi mostrado que este laser possui diversos efeitos em tecidos vivos, conhecidos como bioestimulação por laser.

A fotobiomodulação laser tem sido cada vez mais utilizada com a finalidade de melhorar a qualidade da cicatrização<sup>8</sup>. Os efeitos terapêuticos do laser sobre os diferentes tipos biológicos são amplos e, entre eles, destacam-se os efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos<sup>9,10</sup>, tendo sido demonstrado que a regeneração tissular torna-se mais eficaz quando tratada com laser de baixa intensidade<sup>11-16</sup>. Existem relatos de que a irradiação a laser estimula a secreção do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e da replicação dessas células<sup>17,18</sup>. A irradiação com laser HeNe aceleraria o processo cicatricial, com rede de fibras colágenas melhor elaborada<sup>11,19</sup> e maior deposição de colágeno<sup>16,20,21</sup>, acompanhada de reepitelização e neovascularização mais precoces<sup>13,17,19,22</sup>.

Em situações de deficiência cicatricial, como acontece quando existe isquemia, diabetes e mesmo úlceras de pressão, a irradiação com laser de baixa intensidade poderia ser uma alternativa de recuperação<sup>21,23,24</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade HeNe na cicatrização de feridas cutâneas de ratos.

## Materiais e métodos ::::

Para realização deste estudo, obedeceu-se à Lei Federal n.º 6.638 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Concil for Laboratory Animal Science*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), conforme protocolo n.º 181.06/CEUA-PUC-PR.

Para o estudo, utilizaram-se 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da PUC-PR, com peso médio de 397,84±32,74 gramas e idade entre 100 e 150 dias.

Durante todo o período de estudo, os animais ficaram alojados no Biotério Central da PUC-PR, sendo mantidos cinco espécimes por caixa. Manteve-se a temperatura ambiente em 22±2 °C, o ciclo claro/escuro em 12 horas e a umidade relativa do ar e o volume de ruído próprios do ambiente. Todas as caixas estavam dispostas em prateleiras a igual distância da fonte de luz. Os animais tiveram livre acesso à ração própria para a espécie (NUVILAB, NUVITAL<sup>®</sup>) e à água.

Sob anestesia obtida com injeção muscular (0,1 ml/100g de peso do animal) de uma solução 1:1 de quetamina (50 mg) e xilazina 2% (20 mg), realizou-se a tricotomia da região dorsal com tricótomo, seguindo-se a antisepsia com polivinilpirrolidona-iodo e delimitação do campo operatório com campo esterilizado fenestrado. Em seguida, fez-se uma incisão longitudinal na parte mediana do dorso iniciando abaixo de uma linha imaginária que corresponde à base da inserção das patas anteriores, cuja espessura compreendeu a pele e a tela subcutânea. A ferida tinha aproximadamente quatro centímetros e nela foram aplicados quatro pontos separados, simples, de fio monofilamentar de náilon 4.0, separados um do outro por um centímetro. A aplicação do laser se fez no intervalo dos pontos, o que permitiu três pontos de aplicação (Figura 1). Após o término do ato operatório, os animais receberam dose única de diclofenaco de potássio (10 mg/kg) por via intramuscular com finalidade analgésica<sup>25</sup>. Após a recuperação anestésica, os ratos foram devidamente marcados e distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos distintos, com 30 animais cada um, sendo que receberam a seguinte designação: GE (grupo experimento), tratado com laser, e GC (grupo controle) não tratado.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com o mesmo número de animais para realizar a avaliação temporal no 3º, no 7º e no 14º dia após a cirurgia. Esses subgrupos foram denominados: GE dia 3, GE dia 7 e GE dia 14 e GC dia 3, GC dia 7 e GC dia 14.

Para o tratamento, utilizou-se o aparelho laser HeNe Plasmax IV, LHN 9709 (KLD Biossistemas<sup>®</sup>). As feridas foram tratadas com laser de HeNe com uma densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> sobre uma área de 3 cm<sup>2</sup>, resultando um uso calculado do laser de 12 segundos por ponto da ferida. Para isso, o laser de HeNe foi utilizado com nível contínuo máximo de energia de 5 mW, com comprimento de onda de 632,8 nm e área de raio do laser de 0,015 cm<sup>2</sup>.

Vinte quatro horas depois de realizada a lesão, as feridas dos animais do GE receberam tratamento com laser HeNe, sendo um subgrupo por 3 dias, outro por 7 dias e o último por 14 dias. Para aplicação do laser, os animais foram sedados com propofol, 10 mg/Kg, via intraperitoneal. Os animais do grupo controle receberam a mesma sedação.

Após a análise macroscópica, no 3º, no 7º e no 14º dia, sortearam-se dez animais de cada grupo que foram submetidos à eutanásia, em cada um dos tempos, com dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120 mg/Kg) aplicada na fossa ilíaca esquerda.

Nos animais amostrados, foram ressecados segmentos de pele com área de 5x4 cm que continham, na parte central, a cicatriz. Foi desprezado cerca de meio centímetro das extremidades cranial e caudal do retalho, utilizando-se os três centímetros centrais da cicatriz para o estudo.

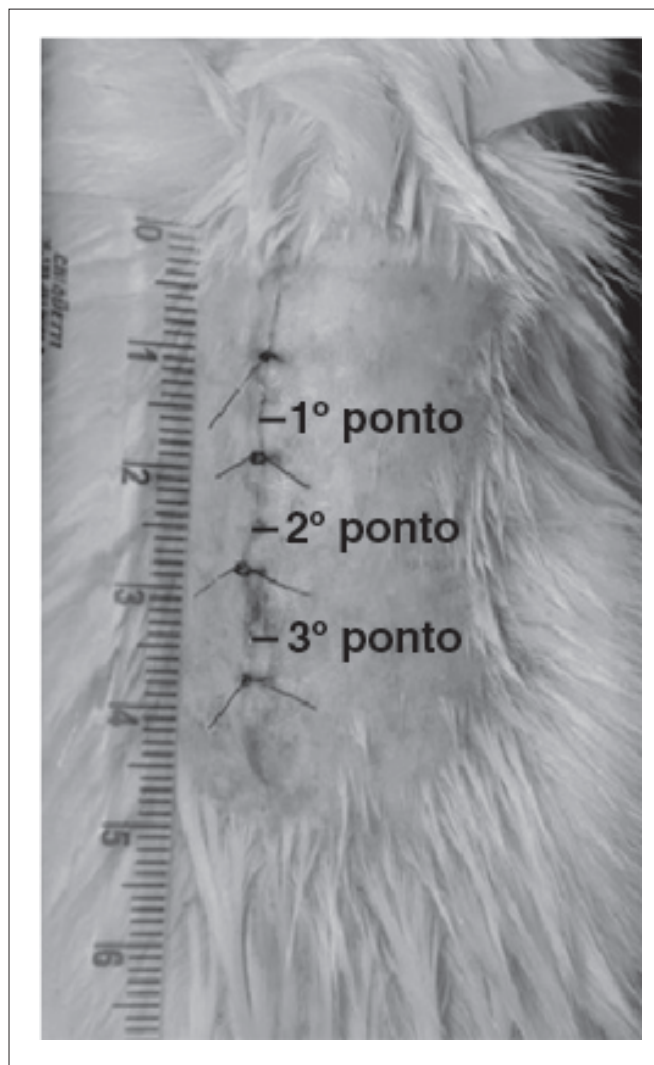
As peças foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas e posteriormente submetidas ao procedimento histológico de rotina. Pela coloração da Hematoxilina-eosina (H&E) foi obtida a avaliação morfológica geral da cicatriz, reconhecendo-se o padrão inflamatório. Foi realizada a leitura de dez campos com ampliação de 400 vezes, conforme padronização descrita por Vizzotto et al.<sup>26</sup> (Tabela 1). Para a contagem das células, adotou-se a escala: nenhuma célula=0; até 50 células=1; de 50 a 100 células=2 e mais de 100 células=3, positiva para monomorfonucleares e negativa para polimorfonucleares<sup>26</sup>.

Após a atribuição dos índices, procedeu-se ao somatório deles, de maneira que cada grupo de animais teve um escore final, permitindo assim a classificação dos grupos em três fases do processo inflamatório<sup>26</sup> (Tabela 2).

Os cortes histológicos tratados pela técnica de coloração Picrosirius (*Picrosirius-red F3BA*) ao microscópio, com luz polarizada, permitiram identificar a densidade do colágeno nas cicatrizes e as frações de colágeno I e III. Nessa técnica, as fibras de colágeno I, mais espessas e fortemente birrefringentes, apresentam-se coradas em tons de laranja ao vermelho, e as de colágeno III, mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes apresentam-se coradas de verde<sup>25</sup>. As imagens foram capturadas pelo sistema Sony® CCD 101/Trinitron®, digitalizadas por placa digitalizadora Oculus TCX® e analisadas pelo aplicativo Image Plus 4.5 para Windows. Para cada lâmina, foi realizada a leitura de três campos, com ampliação de 200 X sobre a área da cicatriz, e foi obtida a média da leitura.

Baseando-se nos percentuais de colágeno tipo I e tipo III, foi calculado o índice da maturação da cicatriz (IMaC<sup>27</sup>), definido como a razão entre o percentual de colágeno tipo I e o percentual de colágeno tipo III. Esse índice varia entre zero (percentual de colágeno tipo I=0 e percentual de colágeno tipo III=100) e mais infinito (percentual de colágeno tipo I=100 e percentual de colágeno tipo III=0). Valores maiores do que um indicam que o percentual de colágeno I é maior do que o percentual de colágeno tipo III e demonstram o estado de maturidade da cicatriz<sup>28</sup>.

Os cortes de tecido para reação CD-45 (LCA - Antígeno Leucocitário clone136-4B5 IV WS - IgG1 da FK-Biotec®), em diluição 1:100, foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria com tampão citrato a 10 mmol/L em pH 6,0 para posterior processamento imunistoquímico. Para garantir a veracidade da coloração, foram realizados controles. Para controle externo



**Figura 1.** Aspecto da ferida ao final do ato operatório, demonstrando os pontos da aplicação do laser.

**Tabela 1.** Metodologia de quantificação dos achados histológicos nos cortes corados pela Hematoxilina-Eosina (H&E).

Parâmetros	Intensidade			
	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Polimorfonucleares	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão	-3	-2	-1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tecido de granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

**Tabela 2.** Caracterização da fase do processo inflamatório conforme o escore final.

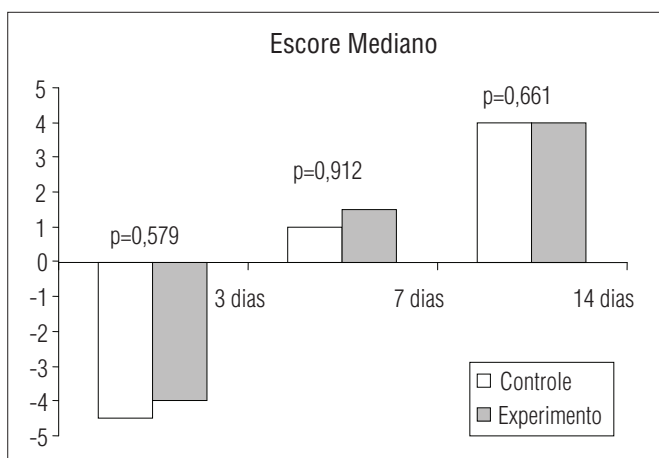
Processo Inflamatório	Escore Final
Agudo	-9 a 3
Subagudo	-2,9 a 3
Crônico	3,1 a 9

positivo, foi utilizado um fragmento de linfonodo. A derme e o epitélio serviram de controle interno negativo. Para análise, foram contadas as células positivas, coradas em marrom, para LCA por campo de grande aumento, num total de dez campos.

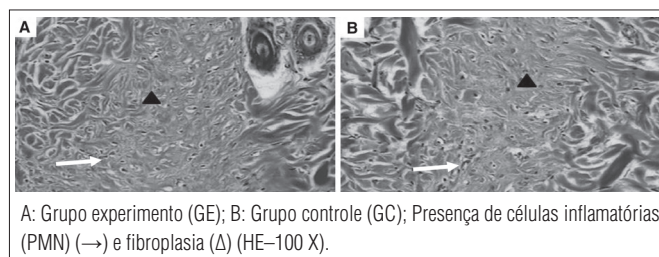
Os resultados descritivos obtidos do estudo foram expressos por médias e desvios-padrão. Para a avaliação do efeito de grupo e do dia de avaliação sobre as variáveis do estudo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com dois fatores (grupo e dia de avaliação). A condição de normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e, para avaliação da homogeneidade das variâncias, foi usado o teste de Levene. Nos casos em que houve interação significativa entre os fatores, a análise foi feita considerando-se o teste *t* de Student para a comparação dos grupos e a ANOVA com um fator para a comparação dos dias de avaliação. Para as comparações múltiplas, foi usado o teste Least Significant Difference (LSD). Para as análises das tabelas do IMaC, foi utilizado o teste de Fischer. O nível de significância estatística adotado foi 0,05.

## Resultados

Nos cortes histológicos das cicatrizes, com três dias de evolução, observou-se, nos dois grupos de estudo, que a inflamação tinha características de processo agudo, evidenciado pelos escores



**Figura 2.** Demonstração gráfica da evolução inflamatória nos grupos controle e experimento nos três tempos avaliados, segundo score de Vizzotto et al.<sup>26</sup>



**Figura 3.** Aspectos histológicos obtidos de cicatrizes no 14º dia pós-operatório.

negativos. No 7º dia, passou a ter características de subagudo e no 14º dia, de crônico, observando-se escores positivos (Figuras 2 e 3).

Em relação à análise do percentual de colágeno tipo I, não se observou diferença significativa entre os grupos nos três momentos analisados ( $p=0,527$ ) (Figura 4A). Encontrou-se maior densidade de colágeno tipo III nas cicatrizes do grupo tratado na avaliação do 3º dia ( $p=0,001$ ). Contudo, nas avaliações do 7º e do 14º dia, as diferenças não foram significantes (Figura 4B).

A avaliação do colágeno total mostrou maior densidade nas cicatrizes do grupo tratado na avaliação do 3º dia ( $p=0,001$ ), sem diferenças significantes nas avaliações do 7º e do 14º dia (Figura 4C).

Quanto ao IMaC, encontrou-se maior maturidade das cicatrizes do grupo controle no 3º dia ( $p=0,026$ ) (Figura 4D). Entretanto, a análise dicotomizada, separando o número de cicatrizes com índice até 1 e as com índice maior do que 1 revelou não haver diferença de frequência entre os grupos. Encontrou-se no 3º dia ( $p=0,474$ ), no 7º dia ( $p=1$ ) e no 14º dia ( $p=1$ ) (Figura 5).

A análise das células inflamatórias pela imunistoquímica permitiu verificar que, nas cicatrizes tratadas, o número delas foi menor do que nas não tratadas nos três tempos avaliados ( $p<0,001$ ), havendo diminuição do número delas mais precocemente nas cicatrizes tratadas (Figura 6 e 7).

## Discussão

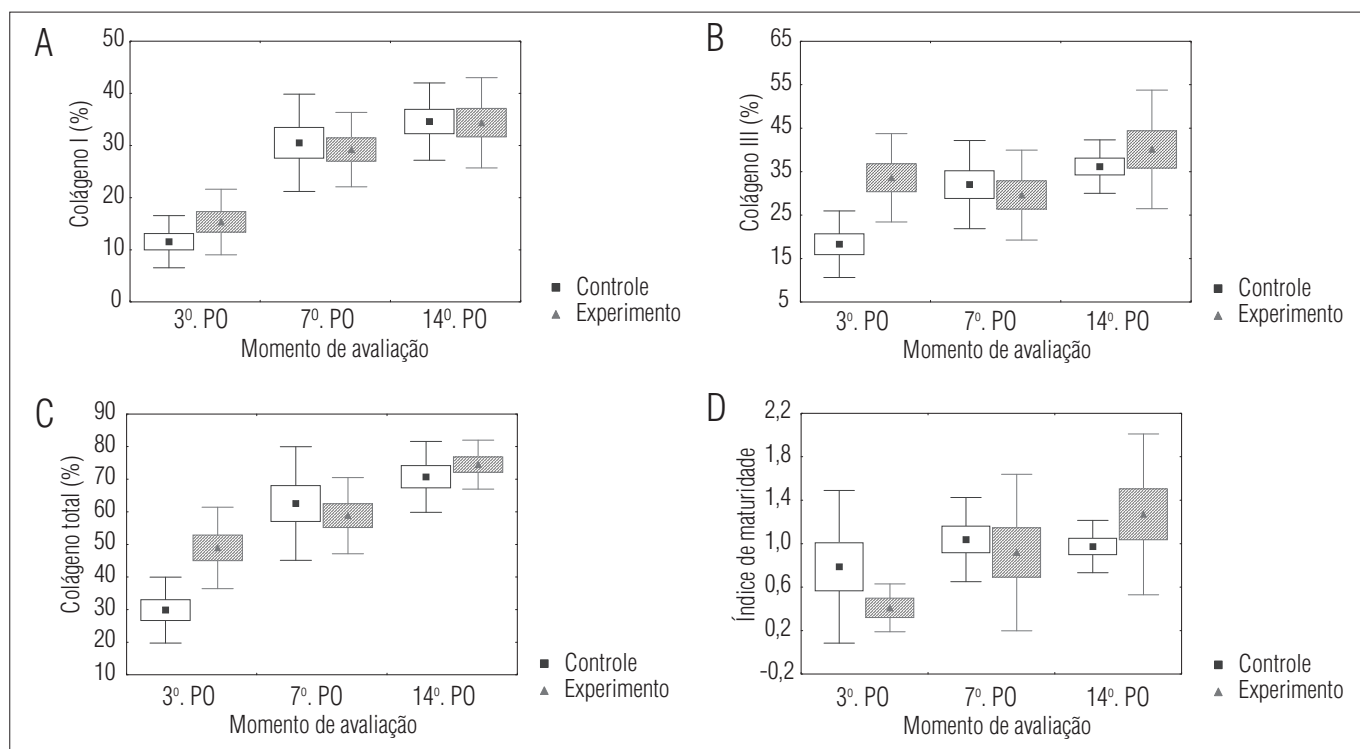
A cicatrização de feridas pode ser beneficiada quando os principais eventos que a possibilitam são estimulados, ou seja, nutrição, proliferação celular e controle da inflamação e infecção, por exemplo<sup>11,12,29</sup>. O laser de baixa intensidade tem sido identificado em diversos estudos, com modelo animais, como coadjuvante na cicatrização devido ao incremento da revascularização, da energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) às células de reparo, à proliferação de fibroblastos e à inibição de mediadores químicos da inflamação<sup>10,24</sup>.

Diante dos principais fatores envolvidos no processo cicatricial, buscou-se identificar, neste estudo, a influência do laser na cicatrização em seus aspectos gerais. Os fatores escolhidos na análise procuraram observar a resolução do processo inflamatório e a síntese de colágeno.

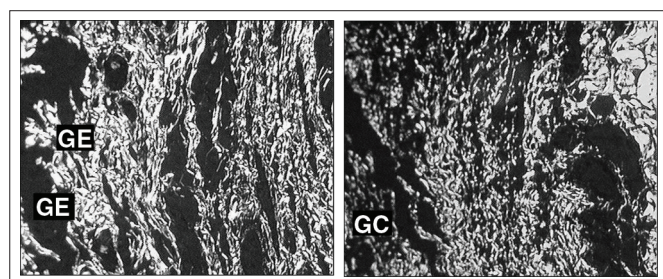
Os resultados confirmam que o laser de baixa intensidade com densidade energética de 4 J/cm<sup>2</sup> promove aumento da deposição de colágeno tipo III no 3º dia pós-operatório.

Carvalho et al.<sup>11</sup> realizaram uma análise morfológica do percentual das fibras colágenas, por densidade de cor, nas cicatrizes de 48 ratos. Utilizaram o laser HeNe com dosagem de 4 J/cm<sup>2</sup> por 36 segundos no grupo experimento. Avaliaram os resultados no 3º, no 7º e no 14º dia do pós-operatório e também constataram aumento significativo no percentual de colágeno do 3º ao 7º dia. Quando comparado o 14º com o 7º dia, observaram uma desaceleração no

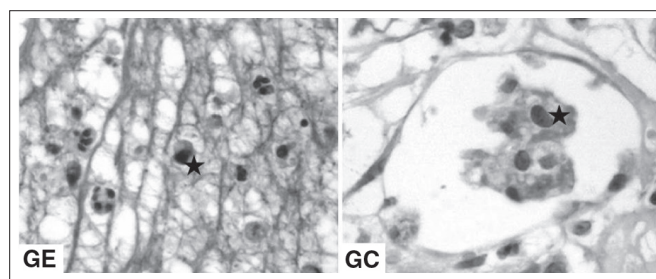




**Figura 4.** Relação das médias percentuais das áreas dos cortes histológicos examinados e representadas por colágeno, nos dois grupos, em cada momento de avaliação e o índice de maturação da cicatriz.



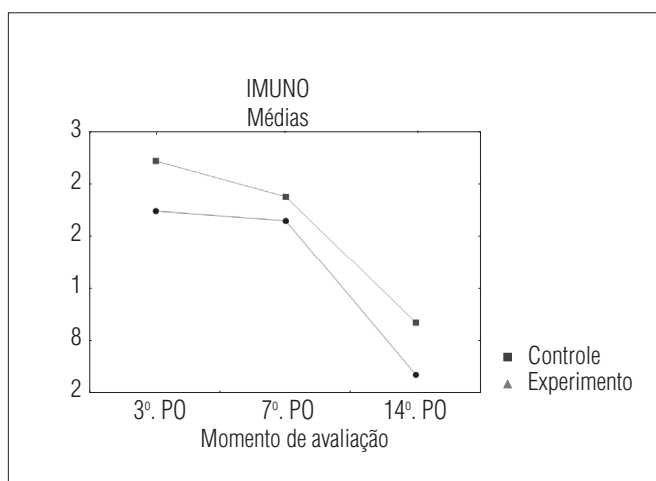
**Figura 5.** Fotomicrografias de cortes histológicos de áreas de cicatrizes dos grupos GE e GC, coradas pelo Sirius Red, sob luz polarizada, (200X) na avaliação do 3º dia.



**Figura 6.** Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45 (\*) na avaliação do terceiro dia (400 X).

percentual de colágeno. Os autores atribuem essa desaceleração ao estado de maturação dessas feridas, uma vez que há relatos de que, na fase de remodelagem/ maturação, a proliferação celular diminui, assim como o número e o tamanho dos fibroblastos.

Pugliese et al.<sup>12</sup> estudaram os efeitos do laser de baixa intensidade sobre ferimentos cutâneos padronizados em 62 ratos Wistar. Utilizaram o laser de Ga-Al-As com diferentes densidades energéticas. Nas análises morfométricas, observaram maior expressão de fibras colágenas, embora sem significância estatística. Constataram que os melhores resultados ocorreram nos grupos irradiados com 4 J/cm<sup>2</sup>. Na avaliação da reação inflamatória, observaram que, nas cicatrizes irradiadas, ocorreu redução do edema, da congestão e do infiltrado inflamatório mais precocemente. Quanto ao incremento da cicatrização, os autores atribuíram ao laser um aumento significativo no depósito de colágeno que pode acontecer por indução da



**Figura 7.** Média de células inflamatórias por campo, marcadas com o anti CD45, em 10 campos.

proliferação celular ou ainda por aumento no processo de síntese e secreção proteica, existindo também a possibilidade de ambos os mecanismos ocorrerem simultaneamente.

De Araújo et al.<sup>19</sup> encontraram mais fibroblastos ativados, mais colágeno e mais incorporação de 3-H-Prolina em cicatrizes de ratos tratadas com laser de baixa intensidade, avaliadas com 8, 15 e 22 dias, e Carvalho et al.<sup>21</sup> relataram que esse efeito pode ser observado em cicatrizes de ratos diabéticos, mostrando que essa terapia poderia ser útil em situações adversas. Medrado et al.<sup>20</sup>, entretanto, observaram discreto aumento da densidade de colágeno.

A maturidade da cicatriz foi avaliada pelo índice de maturação do colágeno. Os cortes corados pelo Sirius Red possibilitaram avaliar o tipo de colágeno e quantificá-lo nas amostras. Diversos autores compararam vários métodos de coloração para análise do colágeno e concluíram que o corante Picrosirius é o mais seletivo, de fácil execução e interpretação, sendo específico para o estudo do colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma<sup>10,27,28</sup>.

Apesar de se ter maior densidade de colágeno tipo III no 3º dia, os resultados do IMAc em análise dicotomizada mostrou que a maturidade das cicatrizes foi semelhante durante todo o tempo de estudo. Na verdade, a densidade de colágeno do tipo I mostrou tendência a ser maior no grupo tratado, mas não conferiu significância estatística. Uma amostra maior poderia solucionar essa dúvida, confirmando ou rejeitando essa tendência. O mesmo se pode dizer das cicatrizes do grupo tratado que, no 7º e no 14º dia de avaliação, mostraram tendência a índices de maturidade maior sem, contudo, ser significativa. Notou-se, no 14º dia, desaceleração do processo de cicatrização, achado já descrito em estudo anterior<sup>5</sup> e que pode ser justificado pela diminuição da proliferação dos elementos celulares nesta fase.

Quando analisadas por meio da imunoistoquímica, a quantidade de células inflamatórias, presentes nas lesões de ambos os grupos, permitiu perceber que, nas cicatrizes do grupo experimento, elas estavam presentes em menor número, fato esse que determina a diminuição significativa do processo inflamatório. Esses achados foram verificados por outros autores<sup>12,16,20</sup>, os quais relataram, ainda, redução do edema inflamatório nos grupos irradiados com laser de baixa intensidade. Para eles, os efeitos positivos do laser na cicatrização tecidual se devem ao incremento da proliferação celular e à expressiva redução do infiltrado inflamatório.

O recurso do laser, apesar de ser empregado desde a década de 70 na prática médica, é ainda objeto de estudo. Na presente pesquisa, verificou-se o incremento da densidade de colágeno tipo III no 3º dia pós-operatório, aumento no percentual total de colágeno, diminuição do infiltrado inflamatório e precoce resolução da fase inflamatória nas feridas irradiadas, fatos esses que justificam a utilização do laser em cicatrização de feridas. É interessante ressaltar que o padrão de reação inflamatório se manteve o mesmo

nos dois grupos, uma vez que no 3º dia era de padrão agudo; no 7º dia, de padrão subagudo e no 14º dia, de padrão crônico. O que ocorreu foi uma reação de menor intensidade.

Se considerarmos que a manutenção do processo inflamatório atrasaria a fibroplasia, era de se esperar que a densidade do colágeno fosse maior nas cicatrizes tratadas, fato não verificado ao longo do processo de cicatrização. Apenas no início se teve maior densidade nas cicatrizes do grupo tratado.

Outros efeitos benéficos do laser de baixa intensidade ao processo de cicatrização são relatados. Reis et al.<sup>16</sup>, utilizando laser GaAlAs (4 J/cm<sup>2</sup>, 9 mW, comprimento de onda=670 nm) por 3 a 5 dias, encontraram, além do aumento da densidade de colágeno, melhor arranjo da matriz extracelular (p<0,05). Relataram fibroblastos em maior número e mais ativos. Houreld e Abrahamse<sup>24</sup> mostraram que o emprego do laser de baixa intensidade de HeNe estimulou a expressão da interleucina-6, a proliferação e a migração celular em diabéticos, melhorando a cicatrização. Silveira, Streck e Pinho<sup>15</sup> demonstraram que o laser de baixa intensidade é capaz de ativar enzimas mitocondriais, como a citocromo-C-oxidase, e melhorar o processo cicatricial.

Embora tenham sido realizados e publicados muitos estudos clínicos favoráveis ao uso do laser, o mecanismo por meio do qual aceleraria o processo de cicatrização ainda não está totalmente elucidado. Ficam hipóteses a serem testadas como: o laser melhora a transcrição de ácido ribonucleico (RNA) ao mesmo tempo que reduz a fase inflamatória e antecipa a fibroplasia? O incremento de oxigênio e ATP favorecido pelo uso do laser é determinado por uma angiogênese precoce? Para assegurar os efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização falta ainda consenso e padronização das variáveis físicas: tempos e técnicas de aplicação, densidades de energia, potências de saída e comprimentos de onda, pois a comparação entre os resultados dos diversos autores tem sido dificultada pelo emprego de metodologias muito diversas. O emprego de laser HeNe (632,8 nm), aplicado com diferentes fluências isso pode levar a diferentes respostas celulares e isso pode impossibilitar as comparações. Hawkins e Abrahamse<sup>30</sup> aplicaram doses de 0,5; 2,5; 5, 10 e 16 J/cm<sup>2</sup>, dois dias consecutivos, a fibroblastos da pele humana. Mostraram que 5 J/cm<sup>2</sup> estimulou a atividade mitocondrial, a proliferação celular e a migração dos fibroblastos. Entretanto, doses mais altas diminuíram a viabilidade das células e a proliferação com dano para a membrana celular e para o DNA<sup>30</sup>.

## Conclusão

A irradiação com laser de baixa intensidade HeNe nas condições do experimento não modifica a qualidade da reação inflamatória, mas diminui a intensidade dela; aumenta a deposição do colágeno no início do processo cicatricial e não interfere na maturação da cicatriz.

## Referências bibliográficas

- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. *An Bras Dermatol*. 2003;78(5):525-40.
- Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Sheperd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(4):442-7.
- England S. Introduction to mid laser therapy. *Physiotherapy*. 1988;74(3):100-3.
- Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med*. 1989;9(5):497-505.
- Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1996;107(4):593-6.
- Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J*. 1996;41(3):188-92.
- Mester E, Nagylucskay S, Döklen A, Tisza S. Laser stimulation of wound healing. *Acta Chir Acad Sci Hung*. 1976;17(1):49-55.
- David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surg Med*. 1996;19(4):458-64.
- Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizzoto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 2. *Fisioter Bras*. 2001;2(6):337-52.
- Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes Jr KS, Barham CD, Waddel DL, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004;22(3):241-7.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JF, Ferreira VJ, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. *Fisioter Bras*. 2003;4(4):253-8.
- 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(4):307-13.
- Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1056:486-93.
- Rocha JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *Rev Bras Promoção Saúde*. 2004;17(1):44-8.
- Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(3):279-82.
- Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):307-13.
- Rocha Jr AM, Andrade LCF, Oliveira RG, Aarestrup FM, Farias RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006;81(2):150-6.
- Ribeiro MS, Da Silva D de F, De Araujo CE, De Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM, et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(1):59-66.
- de Araujo CE, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TM. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(2):87-96.
- Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2003;32(3):239-44.
- Carvalho PT, Mazzer N, dos Reis FA, Belchior AC, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21(3):177-83.
- Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(2):102-6.
- Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21(4):258-62.
- Houreld N, Abrahamse H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm<sup>2</sup> stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. *Diabetes Technol Ther*. 2007;9(5):451-9.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.
- Vizzotto Jr AO, Noronha L, Scheffel LHD, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39(2):143-9.
- Coelho ICML. Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno [tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2003.
- Alves MRA. Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfométrico e imunohistoquímico [tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.
- Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(2):141-50.
- Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2006;38(1):74-83.