

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Faculdade Integral Diferencial- FACID
Programa de Mestrado Interinstitucional em Bioengenharia**

SILVANA MARIA VÉRAS NEVES

**EFEITOS DA TERAPIA COM LED NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU**

São José dos Campos, SP

2010

Silvana Maria Vêras Neves

**EFEITOS DA TERAPIA COM LED NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Interinstitucional em Bioengenharia como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP

2010

N427e

Neves, Silvana Maria Vêras

Efeitos da terapia com LED no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau / Silvana Maria Vêras Neves. Orientadora Profa.Dra. Renata Amadei Nicolau. São José dos Campos, 2010.
1 disco Laser. 89f.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Interinstitucional em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba/ FACID, 2010.

1. Queimaduras 2. Cicatrização I Nicolau, Renata Amadei, Orient. II Título

CDU: 616-001.17

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno: Silvana Maria Vêras Neves

Data: 28/06/10

SILVANA MARIA VÉRAS NEVES

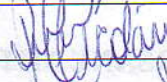
“EFEITOS DA TERAPIA COM LED NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

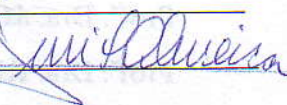
Profª. Dra. **JOSANE MITTMANN** (UNIVAP)



Profª. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)



Prof. Dr. **LUIS VICENTE FRANCO OLIVEIRA** (UNINOVE)



Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 28 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela força, saúde, coragem e determinação nos meus projetos de vida.

Aos meus amados e inesquecíveis pais, José João Neves e Dulce dos Santos Vêras Neves (*in memoriam*), que enquanto estiveram entre nós foram os maiores incentivadores das nossas lutas e conquistas. Devo mais essa vitória a vocês! Obrigada por tudo!

Ao meu amado filho Luís Vitor, pela compreensão e aceitação da minha ausência em momentos importantes de sua vida. Filho! Você me ensinou o verdadeiro sentido da vida. És a razão maior de minha existência.

Ao meu companheiro Luís Carlos, pela compreensão.

À minha irmã Marília, pelo exemplo de dedicação à carreira docente quando exerceu o magistério, que indiretamente me serviu como fonte de inspiração.

Ao meu irmão Mirócles, pela coragem e perseverança em seus negócios, mostrando que não se deve desistir nunca, mesmo que os obstáculos sejam quase intransponíveis.

Aos sobrinhos Raphael, Lyzianne e Daniela, exemplos de dignidade, honestidade e competência profissional.

Aos sobrinhos Igor, Maria Alice, Vinícius, Luana e Amanda, que representam o futuro de nossa família e para que sigam os caminhos que conduzem à vitória.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Renata Amadei Nicolau, pela paciência e dedicação dispensadas a mim nestes dois anos de Mestrado e pelo exemplo de conduta. Minha eterna gratidão pela orientação e incentivo à pesquisa científica.

Ao médico veterinário Antônio Luís Martins Maia, ao biólogo Talvany de Barros e aos acadêmicos, Anderson Bonfim, Elizabeth de Orleans, Analine Silva, Bárbara Cury-Raid e Victor Campos, pela grande contribuição na pesquisa experimental no laboratório da FACID.

Aos diretores da FACID Prof. Paulo Raimundo Machado Vale e Prof^a Maria Joseci Lima Cavalcante Vale, pelo incentivo financeiro durante o curso de Mestrado.

Às professoras da FACID Liana Martha e Ana Maria, que prestaram enorme colaboração nas análises histológicas das lâminas da pesquisa.

Às secretárias da UNIVAP Ivone Paranaíba Vilela, Valéria Maeda, à bibliotecária Rúbia Gravito Gomes e a todos os funcionários, que sempre nos atenderam com simpatia, prontamente quando precisamos.

Ao Prof. Marcelino Martins, Coordenador do Curso de Fisioterapia da FACID, pelo apoio dispensado e pelas horas de descontração durante os experimentos.

Aos colegas do curso de Mestrado, pelos sentimentos de união, confiança, lealdade e solidariedade que transcorreram nos momentos mais difíceis que enfrentamos em sala de aula e nas viagens para São José dos Campos.

“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há quem luta muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida, e esses
são imprescindíveis”

Bertolt Brecht

RESUMO

Estudos recentes demonstram a eficácia da terapia com LED no processo de reparação tecidual. O objetivo deste estudo foi comprovar os efeitos biomodulatórios da terapia com LED na cicatrização de queimaduras de 3º grau, comparativamente ao tratamento com sulfadiazina de prata 1%. Comprimento de onda de 640nm, potência de 110mW, dose total de 16J/cm², tempo de aplicação LED contato e LED sem contato de 41 e 680 segundos, respectivamente, constituíram os parâmetros de irradiação. A amostra compôs-se de 72 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso médio entre 200 e 250 gramas, divididos aleatoriamente nos grupos: controle, sulfadiazina, LED pontual, LED sem contato, LED pontual + sulfa e LED sem contato + sulfa. As irradiações iniciaram-se 24 horas após a queimadura, com intervalos de 48 horas, até a véspera do sacrifício (7 e 14 dias). Na análise da área da lesão o grupo LED sem contato + sulfa apresentou redução superior ($p < 0,001$) ao grupo LED sem contato. A histomorfometria mostrou um número de células inflamatórias estatisticamente superior aos 7 dias no grupo controle em relação ao grupo LED sem contato ($p < 0,01$) e ao grupo LED sem contato + sulfa ($p < 0,05$). O número de fibroblastos no LED sem contato + sulfa foi superior ($p < 0,05$) ao grupo sulfa, aos 7 dias. Concluiu-se que o LED associado à sulfa revelou-se superior em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave: LED. Cicatrização. Queimadura de terceiro grau.

Effect of LED therapy in the healing process of third-degree burns

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated the efficiency of LED therapy on the tissue repair process. The objective of this study was to prove the biomodulatory effects of LED therapy in the healing process of third-degree burns, in comparison with 1% silver sulfadiazine treatment. The irradiation parameters were 640 nm wavelength, 110mW power, and 16J/cm² total dosage. The application time for LED contact was 41 s and LED without contact was 680 s. The sample was composed of 72 male wistar rats, with average mass between 200 and 250 grams, divided randomly into 6 groups: control, sulfadiazine, LED with contact, LED without contact, LED with contact + sulfa, and LED without contact + sulfa. The irradiations began 24 h after the burning, and continued at intervals of 48 hours until the day before sacrifice (days 7 and 14). The analysis of the wounded area showed that the LED without contact + sulfa group had a superior reduction ($p < 0,001$) in relation to the LED group without contact. The histomorphometry showed on day 7 a statically superior number of inflammatory cells in the control group in relation to the LED without contact group ($p < 0,01$) and the LED without contact + sulfa group ($p < 0,05$). The number of fibroblasts in the LED without contact + sulfa group was superior ($p < 0,05$) to the sulfa group on day 7. Thus, LED in association with sulfa was superior in relation to the other treatments.

Key-words: LED. Healing process. Third-degree burns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um corte de pele	21
Figura 2: Fases do processo de cicatrização	25
Figura 3: Cicatrização por primeira intenção	27
Figura 4: Cicatrização por segunda intenção	27
Figura 5: Queimadura de Primeiro Grau	32
Figura 6: Queimadura de Segundo Grau	32
Figura 7: Queimadura de Terceiro Grau.....	33
Figura 8: Depilação do dorso do animal	49
Figura 9: Fotografia ilustrativa do aquecimento da água.....	50
Figura 10: Fotografia ilustrativa da indução da queimadura	50
Figura 11: Irradiação com LED sem contato, atingindo toda a área da lesão	52
Figura 12: Posicionamento da câmera digital para a captura das imagens	53
Figura 13: Calibração do Programa ImageJ.....	54
Figura 14: Determinação da área da lesão	54

Figura 15: Procedimento cirúrgico para obtenção das amostras de pele da área de estudo	55
Figura 16: Equipamentos de captura digital	57
Figura 17: Fotografias ilustrativas da análise microscópica. Imagens digitais de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (7 dias) e Tricrômico de Masson, (14 dias) respectivamente, utilizando objetivas de 40x	58
Figura 18: Área de lesão dos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão	61
Figura 19: Fotomicrografia do grupo LED sem contato + sulfa, 7 dias pós-lesão. Inflamação aguda e neovascularização intensas. Coloração - Hematoxilina e Eosina - 400X.....	62
Figura 20: Fotomicrografia do grupo sulfa, 7 dias pós-lesão. Discreta deposição de fibras colágenas. Coloração - Tricrômico de Masson - 400X	63
Figura 21: Fotografia ilustrativa mostrando a presença de crosta em um animal do grupo LED sem contato, 14 dias pós-lesão.....	63
Figura 22: Fotomicrografia do grupo LED contato + sulfa, 14 dias pós-lesão. Intensa quantidade de fibroblastos. Coloração - Tricrômico de Masson - 400X	64
Figura 23: Fotomicrografia do grupo LED contato + sulfa, 14 dias pós-lesão. Discreta quantidade de colágeno. Coloração - Tricrômico de Masson - 400X.....	65
Figura 24: Número de células inflamatórias presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão	66
Figura 25: Número de vasos sanguíneos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão	68

Figura 26: Número de fibroblastos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.....	69
Quadro 1: Critérios para análise histológica por microscopia óptica	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais, tratamento realizado e eutanásia....	48
Tabela 2: Parâmetros de irradiação com LED utilizados no experimento	51
Tabela 3: Área da lesão (cm ²) em 7 e 14 dias nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média ± desvio padrão.....	60
Tabela 4: Número de células inflamatórias presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média ± desvio padrão	66
Tabela 5: Número de vasos sanguíneos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média ± desvio padrão	67
Tabela 6: Número de fibroblastos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média ± desvio padrão.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

A: área

ABVD: Doxorrubicina [Adriamycin], bleomicina, vinblastina e dacarbazina

AGE: ácidos graxos essenciais

ANOVA: Análise de variância

bFGF: Fator de crescimento fibroblástico básico

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

cm: centímetros

cm²: centímetros quadrados

CO₂: dióxido de carbono

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DE: densidade de energia

DP: densidade de potência

E: energia

FACID: Faculdade Integral Diferencial

FACIME: Faculdade de Ciências Médicas

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Drogas)

GaAs: *Gallium Arsenide* (Arseneto de Gálio)

GaAlAs: *Gallium Aluminum Arsenide* (Arseneto de Gálio e Alumínio)

He-Ne: *Helium Neonium* (Hélio Neônio)

HGV: Hospital Getúlio Vargas

InGaAlP: *Aluminium Gallium Indium Phosphide* (Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio)

IP&D: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

J: joules

J/cm²: joules por centímetro quadrado

Laser: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

LED: *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

LLLT: *Low Level Laser Therapy* (Terapia com Laser de Baixa Potência)

MEC: Matriz extracelular

mW: miliWatts

NASA: *National Aeronautics and Space Administration* (Administração Nacional do Espaço Aeronáutico)

NIR: *Next Infra Red* (Infravermelho Próximo)

nm: nanômetros

Ø: diâmetro

P: potência

PBM: fotobiomodulação

PMN: polimorfonucleares

s: segundos

SBCP: Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica

SBQ: Sociedade Brasileira de Queimaduras

t: tempo

TIFF: *Tagged Image File Format*

TLBP: Terapia com Laser de Baixa Potência

UESPI: Universidade Estadual do Piauí

UNIVAP: Universidade do Vale do Paraíba

UQ: Unidade de Queimados

W: watts

W/cm²: watts por centímetro quadrado

λ : comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Pele.....	20
2.2 Processo Cicatricial.....	21
2.2.1 Fase Inflamatória ou Exsudativa.....	22
2.2.2 Fase Proliferativa	23
2.2.3 Fase de Maturação ou Remodelação	24
2.3 Tipos de Cicatrização.....	26
2.4 Fatores que Interferem na Cicatrização	28
2.4.1 Fatores Locais	28
2.4.2 Fatores Sistêmicos.....	28
2.4.3 Tratamento Tópico Inadequado	29
2.5 Queimadura	29
2.5.1 Agentes Causais.....	30
2.5.1.1 Agentes Físicos.....	30
2.5.1.2 Agentes Químicos.....	31
2.5.1.3 Agentes Biológicos.....	31
2.5.2 Classificação das Queimaduras.....	31
2.5.3 Extensão ou Severidade da Queimadura	33
2.5.4 O Tratamento das Queimaduras.....	34
2.5.4.1 O Atendimento inicial	34
2.5.4.2 O Curativo.....	35
2.5.4.2.1 O Uso Tópico da Sulfadiazina de Prata a 1%	37
2.6 Fototerapia com Luz Coerente (laser) e com Luz não Coerente (LED)	37
2.6.1 Fototerapia com Luz Coerente.....	39
2.6.2 Fototerapia com Luz não Coerente (LED)	42
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4 METODOLOGIA.....	47

4.1 Tipo de Estudo	47
4.2 Aspectos Éticos	47
4.3 Amostra.....	47
4.4 Anestesia	49
4.5 Depilação	49
4.6 Indução da Queimadura Experimental	50
4.7 Fototerapia com LED	51
4.8 Uso Tópico da Sulfadiazina de Prata	52
4.9 Análise Macroscópica	53
4.10 Análise Histológica.....	55
4.11 Morfometria e Histomorfometria.....	57
4.12 Análise Estatística.....	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Análise Macroscópica da Área de Lesão	60
5.2 Análise Histológica.....	62
5.3 Análise Histomorfométrica	65
5.3.1 Contagem de Células Inflamatórias	65
5.3.2 Contagem de Vasos Sanguíneos.....	67
5.3.3 Contagem de Fibroblastos	68
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Ensaios Clínicos	71
6.2 Evolução da Reparação Tecidual	72
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	88

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de queimaduras determina um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Apesar dos crescentes progressos obtidos no tratamento dos grandes queimados, ainda são consideráveis as taxas de morbidade e mortalidade. As estratégias preventivas implantadas ainda não foram capazes de alterar significativamente o quadro epidemiológico das queimaduras.

Queimadura é a lesão de um tecido produzida pelo efeito do calor, de substâncias químicas, da radiação ou da eletricidade.

O processo de cicatrização dessas lesões é altamente complexo, ocorrendo uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos, tais como: inflamação, coagulação, proliferação celular, epitelização e remodelação, que são agrupados em três fases: a inflamatória, a proliferativa e a de maturação (MARTINS; ANDRADE, 2007).

Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), no Brasil acontece anualmente um milhão de casos de queimaduras, sendo 200 mil atendidos em serviços de emergência e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de trânsito e homicídios (VALE, 2005).

De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP), 43% dos queimados são crianças com idade entre zero e dez anos; 51% dos acidentes acontecem dentro dos domicílios, sendo 80% deles na cozinha, e as pessoas mais atingidas são as de classe social mais baixa (BRASIL, 2000).

Como não é possível prevenir totalmente a ocorrência dessas lesões, tornam-se necessários novos estudos que resultem em modos de intervenções que minimizem o sofrimento das vítimas, acelerem o processo de cura, reduzam custos, complicações secundárias e o tempo de hospitalização.

Há, na atualidade, novas referências terapêuticas, com tecnologia avançada, empregadas na Medicina, Odontologia e Fisioterapia, que têm evoluído de forma extraordinária, a ponto de existirem diversos centros de pesquisa no Brasil e no

mundo, voltados para o desenvolvimento de trabalhos científicos. Cita-se a laserterapia e a terapia com LED.

Pesquisas desenvolvidas em modelos experimentais sugerem que a terapia com laser de baixa potência (TLBP) modula positivamente a atividade e a proliferação celular, a angiogênese e a síntese de colágeno (RABELO et al., 2006; MELLO; SAMPEDRO; PICCININI, 2007; DALL-AGNOL et al., 2009; MEDEIROS et al., 2009).

Carvalho et al. (2006), Rabelo et al. (2006) e Dall-Agnol et al. (2009) evidenciaram em pesquisa com ratos diabéticos e não-diabéticos a influência da terapia com laser de HeNe (632,8 nm) sobre a cicatrização de feridas cutâneas. Os resultados apontaram para o aumento do percentual de fibras colágenas, tanto para o grupo diabético como para o não diabético após fototerapia.

Diversos estudos vêm empregando a laserterapia no sentido de otimizar o processo de reparação tecidual (BYRNES et al., 2004; AL-WATBAN; DELGADO, 2005; GÁL et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007), pela importância dos seus efeitos biomodulatórios. O crescente interesse relaciona-se com a expressiva quantidade de experimentos controlados em animais e humanos, no entanto, a terapia com LED, cujos efeitos são semelhantes, é ainda pouco investigada, carecendo de mais pesquisas para comprovação científica desses efeitos.

O LED (*Light Emitting Diode*), que significa diodo emissor de luz, é uma tecnologia desenvolvida pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), para estimular o crescimento das plantas no espaço e que provoca fisiologicamente o mesmo efeito em células humanas (MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, 2000).

Harry T. Whelan, professor de Neurologia, Pediatria e de Medicina Hiperbárica no *Medical College of Wisconsin* (2000), descobriu que úlceras cutâneas em ratos diabéticos e outras feridas, cicatrizaram muito mais rapidamente quando irradiados com LED.

As condutas atuais de tratamento realizadas em pacientes com queimaduras cutâneas de terceiro grau fundamentam-se em métodos conservadores, visto que tais procedimentos baseiam-se no uso de terapias tópicas, as quais provocam muito sofrimento às vítimas na sua aplicação e cujos resultados esperados demoram muito tempo. Uma dessas drogas amplamente utilizada em hospitais públicos é a sulfadiazina de prata a 1%, porém, esta modalidade de tratamento convencional não

supre todas as necessidades de resolução das lesões cutâneas, havendo casos em que os pacientes necessitam de enxertos de pele.

A terapia com LED é ainda pouco investigada e com escassez de publicações a respeito de sua aplicação em lesões cutâneas por queimadura, associada ou não a terapias convencionais. Alguns trabalhos sugerem que o LED, possui os mesmos efeitos terapêuticos que TLBP, e que lesões na pele de ratos diabéticos e não diabéticos reparam-se mais rapidamente através da terapia LED, favorecendo o processo de cicatrização, agindo na síntese protéica do colágeno e auxiliando na remodelação da ferida (AL-WATBAN; ANDRES, 2003; VINCK et al., 2003; WHELAN et al., 2003; LEITE et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A pele constitui o revestimento externo e o maior órgão do corpo humano, sendo responsável pela proteção do organismo. Tem como funções a absorção, a regulação da temperatura, o equilíbrio hidroeletrolítico e as percepções tátil, térmica, dolorosa e de pressão. Apresenta três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Possui ainda os órgãos anexos: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas (THOMPSON; SKINNER; PIERCY, 2002).

Guirro e Guirro (2004) pontuam que o Sistema Tegumentar protege o organismo da invasão bacteriana, excreta metabólitos e retém líquidos, constituindo-se no mais extenso órgão sensorial do corpo. Qualquer lesão desta superfície de revestimento permite uma interrupção destes mecanismos e tem significado grave.

Azulay e Azulay (2006) referem que a pele (Figura 1) constitui-se de três camadas:

- **Epiderme:** tecido epitelial estratificado queratinizado, cuja porção mais profunda é constituída de células epiteliais que se proliferam continuamente para que seja mantido o seu número. Possui quatro ou cinco camadas ou extratos: camada basal; camada espinhosa ou de Malpighi; camada granulosa; camada córnea e camada lúcida, sendo esta última, mais proeminente em áreas espessas da pele, podendo estar ausente em outros locais.

- **Derme:** espessa camada de tecido conjuntivo, na qual são encontradas algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas. Nela são acomodados vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Fibroblastos, histiócitos, células dendríticas e mastócitos são suas células residentes, enquanto que, linfócitos, plasmócitos e outros elementos celulares do sangue são encontrados em número variável e de forma transitória. Possui a camada papilar, mais superficial, a camada reticular, a mais profunda e a camada adventícia, disposta em torno dos anexos (pêlos, unhas e glândulas) e vasos, e constituída de feixes finos de colágeno, como na derme papilar.

- **Hipoderme:** um tecido sobre o qual a pele repousa e é formado por tecido conjuntivo que varia do tipo frouxo ou adiposo ao denso, nas várias localizações e nos diferentes indivíduos, conectando frouxamente a pele e a fáscia dos músculos subjacentes, o que permite aos músculos contraírem-se sem repuxar a pele.

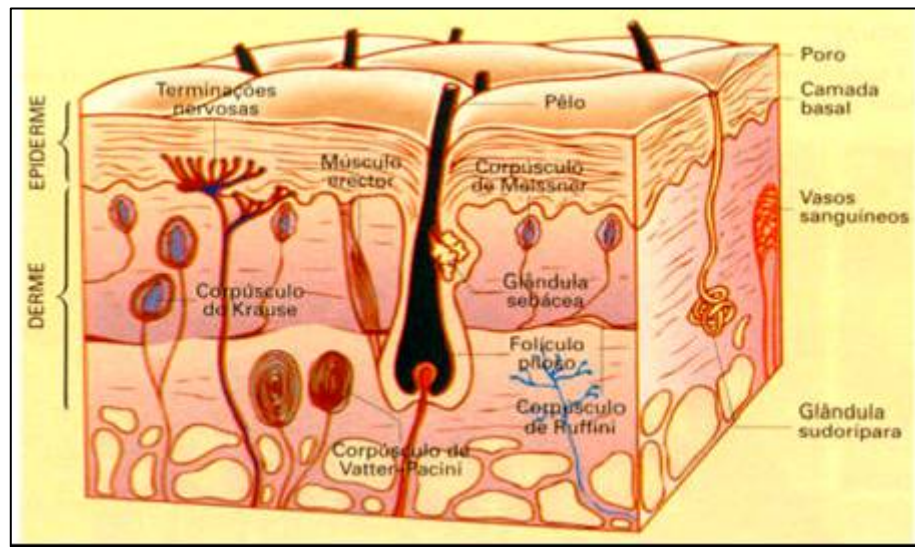


Figura 1: Esquema de um corte de pele.
Fonte: www.dermatologia.net

2.2 Processo Cicatricial

O processo cicatricial é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. Surge como resposta tecidual às lesões, sejam induzidas por traumatismo ou por procedimentos cirúrgicos. Envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. A partir da lesão tecidual o dano na pele pode ficar restrito à epiderme ou atingir a derme (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

A cicatrização constitui um conjunto de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, envolvendo a migração de células inflamatórias, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e proteoglicanas e maturação da cicatriz, estando associado à intensa remodelação. É componente necessário ao processo de reparação, por proporcionar os mecanismos,

pelos quais, o tecido lesado é preparado para a reconstrução (SANTOS, 2000; GARROS et al., 2006).

Quando ocorre a lesão na pele, inicia-se imediatamente o processo de cicatrização. A restauração do tecido cutâneo ocorre por meio de um processo complexo, contínuo e interdependente, composto por uma série de fases sobrepostas, que somadas determinam a cicatrização (BRASIL, 2002).

2.2.1 Fase Inflamatória ou Exsudativa

Andrade (2004) pontua que, logo após a lesão, os tecidos lesionados liberam mediadores químicos da inflamação, desencadeando um processo inflamatório agudo e conduzindo o exsudato fibrinoso para a superfície, o qual, em contato com o ar, resseca e forma uma crosta, ajudando a conter a hemorragia.

Há uma reação imediata ao trauma, ocorrendo uma vasoconstrição na tentativa de reduzir o sangramento e levar à hemostasia, para em seguida acontecer a remoção de restos celulares e microorganismos. Os elementos envolvidos são as plaquetas e coágulos de fibrina que ativam a cascata da coagulação, resultando na liberação de substâncias para a formação da matriz extracelular provisória, que constitui o suporte para a migração de células inflamatórias, seguida da ativação dos mecanismos de proteção e preparação dos tecidos, para o desenvolvimento da cicatrização (BRASIL, 2002; CÂNDIDO, 2006).

A duração dessa fase é de aproximadamente 48 a 72 horas. Caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais prodrômicos da inflamação: dor, calor, rubor e edema. Mediadores químicos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos leucócitos. Os neutrófilos combatem os agentes invasores e os macrófagos realizam a fagocitose (GARROS et al., 2006).

A inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos.

Os PMN surgem no momento da lesão tecidual e permanecem por um período que varia de três a cinco dias, sendo, portanto, os responsáveis pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante no

início do reparo tecidual. Permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento do tecido de granulação. Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. A fase inflamatória conta ainda com o importante papel da fibronectina, sintetizada por células como os fibroblastos, os queratinócitos e células endoteliais, cuja característica é aderir, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; CÂNDIDO, 2006).

2.2.2 Fase Proliferativa

É a fase que compreende os estágios de granulação, contração e epitelização. Durante o estágio de granulação acontece a formação de um novo tecido, constituído de novos capilares (angiogênese), acontecendo a proliferação e a migração de fibroblastos responsáveis pela síntese do colágeno. A partir da produção do colágeno, ocorre um aumento da força da úlcera, denominada força de tração e é caracterizada como a capacidade da ferida resistir às forças externas e não se romper. No estágio seguinte ocorre a epitelização, no qual ocorrerá o fechamento das superfícies da úlcera, por meio da multiplicação das células epiteliais da borda, com conseqüente redução da capilarização e pelo aumento da deposição de colágeno (BOGLIOLO, 1978; BRASIL, 2002; CÂNDIDO, 2006).

Tem a duração de 12 a 14 dias e é responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita. Nesta fase ocorrem angiogênese, produção de colágenos jovens pelos fibroblastos e intensa migração celular, principalmente queratinócitos, promovendo a epitelização (GARROS et al., 2006).

Andrade (2004) considera uma etapa de grande importância, que se inicia em dois ou três dias após a lesão e 50% a 70% da área é reduzida nessa fase. Logo após a lesão há uma proliferação de miofibroblastos, os quais se diferenciam nos

tecidos vizinhos e estabelecem junções ente si, formando um eficiente arcabouço contrátil, responsável pela aproximação das bordas da ferida.

A fase proliferativa é dividida em três subfases: a reepitelização, a fibroplasia e a angiogênese.

Durante a reepitelização, os queratinócitos não danificados migram das bordas da ferida e dos anexos epiteliais quando esta é de espessura parcial, e apenas das margens, nas de espessura total. Na segunda etapa da proliferação ocorre a fibroplasia e formação da matriz extracelular, que é muito importante na formação do tecido de granulação. A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula essencial na formação da matriz e produtor de colágeno, elastina, fibronectina e glicosaminoglicana, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico. A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (BOGLIOLO, 1978; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; CÂNDIDO, 2006).

2.2.3 Fase de Maturação ou Remodelação

A terceira etapa ocorre no colágeno e na matriz, podendo durar de meses a anos. Ocorre reorganização do colágeno, que adquire maior força tênsil e diminui o eritema. A cicatriz assume a coloração semelhante à pele adjacente (GARROS et al., 2006).

Durante a remodelagem ocorre a diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, levando à maturação da cicatriz. Nesta fase acontece também a reorganização do processo de reparação da lesão, com o depósito de colágeno. Inicialmente a cicatriz tem aspecto plano, vai se enrijecendo e se eleva e após um determinado tempo começa a se tornar mais clara, menos rígida e mais plana, ocorrendo sua redução (BRASIL, 2002).

Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão para aumentar a força da cicatriz e diminuir sua espessura. A neovasculatura diminui, e

tardiamente a cicatriz é considerada avascular (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; CÂNDIDO, 2006).

Em resumo, as fases do processo de cicatrização podem ser observadas na figura 2.

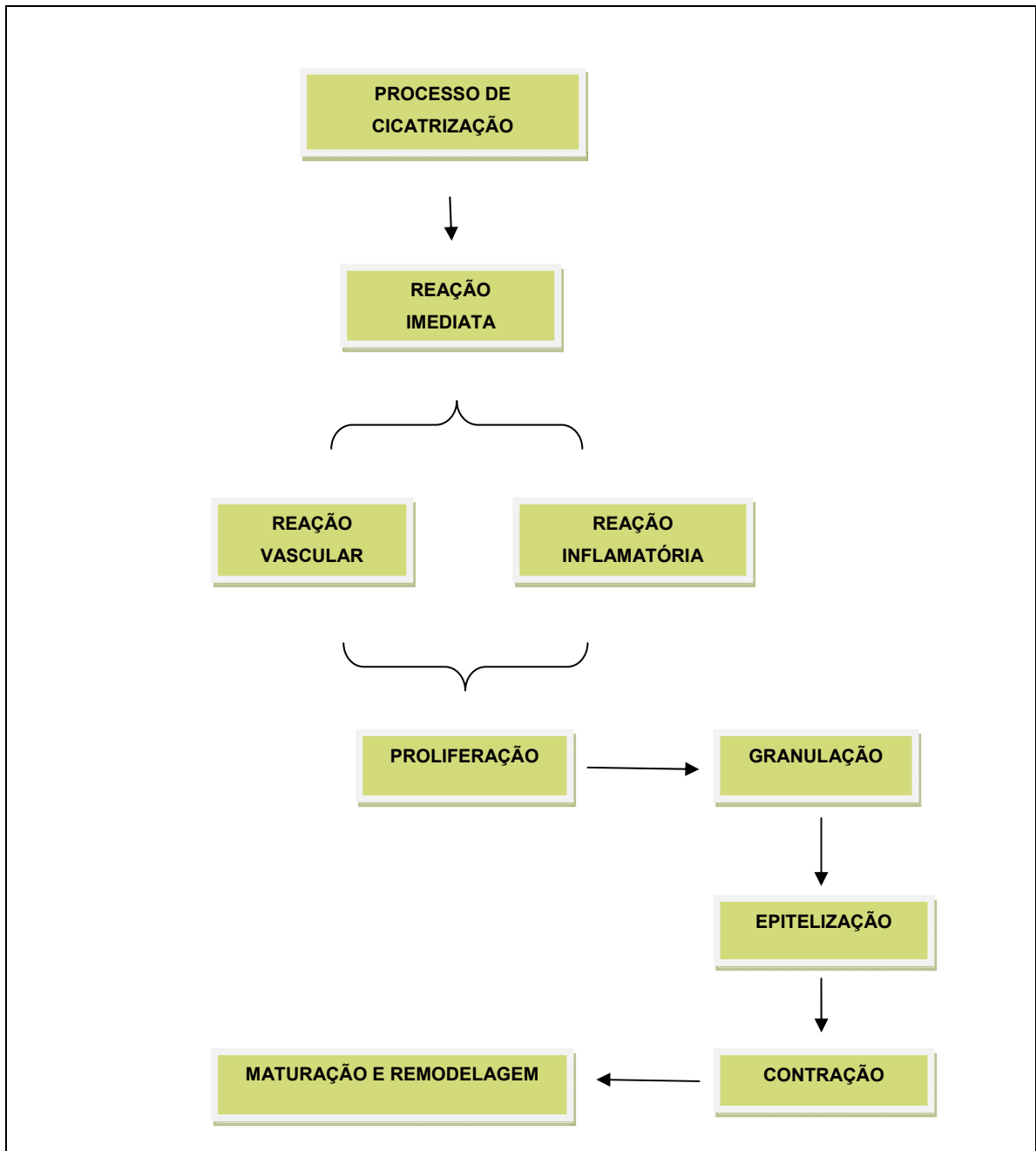


Figura 2: Fases do processo de cicatrização.

Fonte: BRASIL, 2002.

2.3 Tipos de Cicatrização

O processo de fechamento de uma ferida cutânea pode ser descrito como de primeira, segunda ou terceira intenção. Ocorrem de acordo com a quantidade de tecido perdido, os agentes causadores da lesão e o conteúdo microbiano.

Segundo Rocha (2004), Bogliolo Filho (2004) e, Jorge e Dantas (2005), na cicatrização por primeira intenção ocorre perda mínima de tecido. É possível a junção das bordas da lesão com redução do risco de infecção e está associada a feridas limpas e suturadas (Figura 3). Acontece dentro do limite fisiológico esperado e deixa cicatriz mínima ocorrendo pelo seguinte mecanismo: no espaço entre as margens da ferida, forma-se um coágulo a partir do sangue extravasado, onde surgem fatores quimiotáticos e vasoativos que promovem a exsudação de líquidos do sangue para as margens da lesão, e então, após aproximadamente 6 horas é possível observar a presença de fagócitos, e por volta de 24 horas, o coágulo é invadido por essas células, predominando os polimorfonucleares (PMN). O número de PMN reduz-se após as 48 horas e o exsudato passa a ser constituído predominantemente por macrófagos. Nesse espaço de tempo, as células da camada basal da epiderme entram em mitose e migram sobre a superfície do coágulo, recompondo o epitélio. A seguir, ativam-se os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens, proliferam-se e começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular (MEC), que são os colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas, secretadas e localizadas no espaço extracelular.

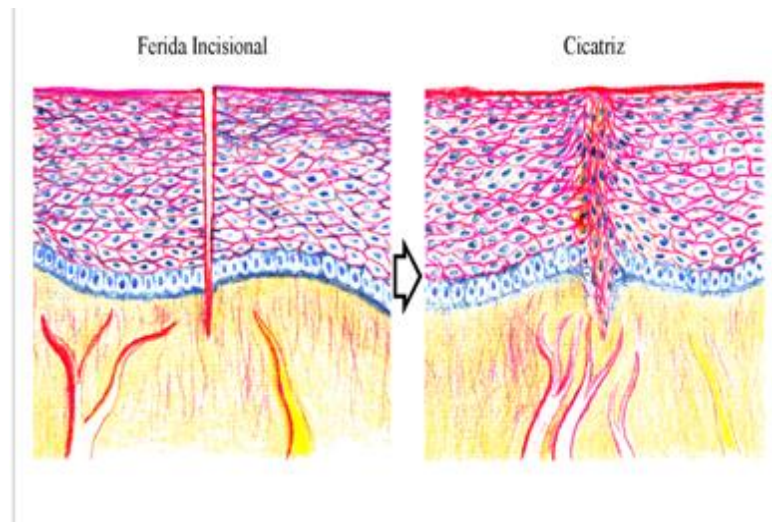


Figura 3: Cicatrização por primeira intenção. As margens estão próximas e o processo de cicatrização evolui naturalmente.
Fonte: www.misodor.com/CICATRIZACAO.html

Na cicatrização por segunda intenção há perda acentuada de tecido, a junção dos bordos cicatriciais não é possível. Há desvio da sequência esperada de reparo tecidual, se relaciona a lesões infectadas, com produção extensa de tecido de granulação e produção significativa de cicatrização, como mostra a figura 4.

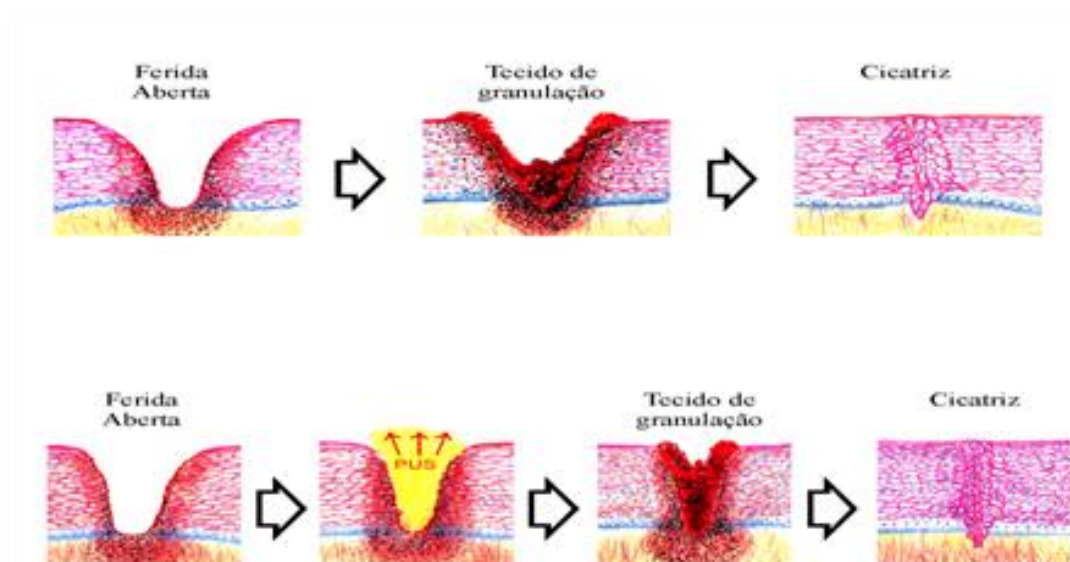


Figura 4: Cicatrização por segunda intenção. **Superior:** Ferida aberta não infectada. Ocorre o aporte de tecido de granulação, que se contrai e forma-se a cicatriz. **Inferior:** Ferida infectada. Há produção de pus no tecido de granulação. Após eliminação das bactérias o tecido de granulação contrai-se e forma uma cicatriz.

Fonte: www.misodor.com/CICATRIZACAO.html

Nas cicatrizações por terceira intenção ocorrem interferências de fatores que retardam o processo cicatricial de uma ferida inicialmente submetida a um fechamento por primeira intenção. Um exemplo é quando uma incisão é deixada aberta para drenagem do exsudato e a aproximação das bordas é promovida pelo cirurgião, posteriormente.

2.4 Fatores que Interferem na Cicatrização

Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003a) classificam-nos como fatores locais, sistêmicos e tratamento tópico inadequado.

2.4.1 Fatores Locais

São fatores ligados à lesão, que podem interferir no processo cicatricial:

- Dimensão e profundidade da lesão;
- Grau de contaminação;
- Presença de secreções;
- Hematoma e corpo estranho;
- Necrose tecidual;
- Infecção local.

2.4.2 Fatores Sistêmicos

São fatores relacionados ao paciente, como, por exemplo:

- **Faixa etária:** a idade avançada diminui a resposta inflamatória.
- **Estado nutricional:** interfere em todas as fases da cicatrização. A hipoproteinemia diminui a resposta imunológica, síntese de colágeno e

função fagocítica.

- **Doenças crônicas:** enfermidades metabólicas sistêmicas, como o diabetes, podem interferir no processo cicatricial.
- **Associação de terapia medicamentosa:** pode interferir no processo cicatricial, como, por exemplo: antiinflamatórios; antibióticos; agentes quimioterápicos.

2.4.3 Tratamento Tópico Inadequado

A utilização de sabão tensoativo na lesão cutânea aberta pode ter ação citolítica, afetando a permeabilidade da membrana.

Aplicação de soluções anti-sépticas também pode ter ação citolítica. Quanto maior for a concentração do produto maior será a sua citotoxicidade, afetando o processo cicatricial. Essa solução em contato com secreções da ferida tem a sua ação comprometida.

2.5 Queimadura

A queimadura pode ser definida como uma lesão produzida no tecido de revestimento do organismo, por agentes térmicos, produtos químicos, eletricidade, e radiação, que resulta em perda e deterioração das funções da pele (THOMPSON; SKINNER; PIERCY, 2002).

As queimaduras podem lesar a pele, os músculos, os vasos sanguíneos, os nervos e os ossos. Além dos danos físicos e da dor, as vítimas de grandes queimaduras sofrem social e emocionalmente.

Quando o tecido é lesado, ocorre o extravasamento de líquido do interior dos vasos sanguíneos, o que leva à produção de um edema. Em uma queimadura muito extensa, a perda de grande volume de líquido desses vasos pode levar ao choque,

causando uma queda brusca da pressão arterial, reduzindo o sangue que flui para o cérebro e outros órgãos vitais (VALE, 2005).

Como apontam Ferreira et al. (2003), a permanência dos pacientes nas unidades de queimados (UQ) no Brasil varia de 15 a 90 dias, dependendo da gravidade e dos procedimentos adotados. Banhos e curativos fazem parte da rotina terapêutica diária. Sintomas como dor e ansiedade, que variam em função do nível e da extensão da queimadura são atribuídos às trocas diárias de curativos e à realização de outros procedimentos.

Os sobreviventes de queimaduras graves ainda carregam um pesado fardo de sequelas físicas, psicológicas e sociais que geram grande sofrimento a ser superado. O paciente que sofreu queimaduras e necessita de internação hospitalar, será afetado por uma diversidade de modificações orgânicas, tais como: alterações no equilíbrio endócrino, perda de líquidos, dor, potencial para infecção, além de desequilíbrios emocionais advindos de circunstâncias como: quebra da dinâmica familiar, afastamento das atividades laborais, comprometimento de algumas funções do corpo que limitam as atividades de vida diária, perda da autonomia, ansiedade e tensão permanente durante a fase crítica da lesão (GOMES; SERRA; MACIEIRA, 2001).

2.5.1 Agentes Causais

De acordo com Vale (2005), os agentes causadores dessas lesões classificam-se em agentes físicos, químicos e biológicos.

2.5.1.1 Agentes Físicos

- **Térmicos:** líquidos e gorduras quentes, ferro quente, vapor e através do fogo;
- **Elétricos:** corrente de baixa voltagem (eletrodomésticos), alta tensão e raios;
- **Radianes:** resultam da exposição à luz solar ou a fontes nucleares.

2.5.1.2 Agentes Químicos

- Substâncias químicas industriais;
- Produtos de uso doméstico, como: solventes, soda cáustica, alvejantes ou qualquer ácido ou álcalis.

2.5.1.3 Agentes Biológicos

- Seres vivos como: taturanas, água viva, urtiga.

2.5.2 Classificação das Queimaduras

Guirro e Guirro (2004) referem que, de acordo com a profundidade do trauma na pele, as queimaduras classificam-se em diferentes graus:

- **Primeiro grau:** superficial, atinge somente a epiderme, caracteriza-se por quadro doloroso pronunciado, discreto edema local e hiperemia, sem a presença de bolhas. Não ocorrem alterações clínicas ou hemodinâmicas importantes. São exemplos os eritemas causados pelo sol ou pelo contato com líquidos aquecidos, com ausência de bolhas ou flictenas (Figura 5).



Figura 5: Queimadura de Primeiro Grau.
Fonte: <http://www.queimados.com.pt/Portals/0/imag9.jpg>

- **Segundo grau:** intermediário, atinge a epiderme e parte da derme. Caracteriza-se por dor acentuada, vermelhidão e formação de bolhas ou flictenas. O contato com líquidos superaquecidos pode ser citado como exemplo desse tipo de queimadura (Figura 6).



Figura 6: Queimadura de Segundo Grau.
Fonte: <http://www.dermis.multimedica.de/dermisroot/pt/43011/image.htm>

- **Terceiro grau:** atinge todas as camadas de revestimento da pele, músculos e ossos. Ocorre necrose da pele e caracteriza-se pela ausência de dor (devido à destruição das terminações nervosas da sensibilidade), pele dura e seca,

escurecida ou esbranquiçada, ladeada por áreas de eritema (Figura 7). São exemplos, as queimaduras provocadas por eletricidade e por incêndios graves.



Figura 7: Queimadura de Terceiro Grau.

Fonte: <http://www.queimados.com.pt/Portals/0/imag12.jpg>

2.5.3 Extensão ou Severidade da Queimadura

O tipo e o grau da queimadura não são tão importantes, mas sim a extensão da pele queimada, ou seja, a área corporal atingida. Thompson, Skinner e Piercy (2002) definem como:

- **Baixa:** menos de 15% da superfície corporal atingida;
- **Média:** entre 15 e menos de 40% da pele coberta;
- **Alta:** mais de 40% do corpo queimado.

Em relação ao prognóstico, a cura depende da profundidade e da localização da queimadura. Nas queimaduras superficiais (queimaduras de primeiro grau e de segundo grau), as camadas mortas da pele despregam e a epiderme volta a crescer para cobrir as camadas inferiores. Uma nova camada de epiderme pode crescer rapidamente a partir da base de uma queimadura superficial sem deixar cicatriz ou, quando muito, uma pequena cicatriz. As queimaduras profundas lesam a derme. Uma nova camada de epiderme cresce, porém lentamente, a partir das bordas da área lesada e de qualquer remanescente da epiderme queimada. Conseqüentemente, a

cura é muito lenta e a cicatriz é considerável. A área afetada também tende a contrair, deformando a pele e comprometendo o seu funcionamento (VALE, 2005; GUIRRO; GUIRRO, 2004).

2.5.4 O Tratamento das Queimaduras

O tratamento das queimaduras pode ser dividido em atendimento inicial e curativo.

2.5.4.1 O Atendimento Inicial

A abordagem inicial correta é condição primordial para uma boa evolução das queimaduras. Os primeiros socorros para as queimaduras leves consistem em mergulhar a área lesada imediatamente em água fria para o alívio da dor.

Nos serviços de saúde, a queimadura é lavada cuidadosamente com água e sabão, para que todos os resíduos sejam removidos e no caso de haver sujeira aderida à superfície cutânea, a área pode ser anestesiada para retirá-la. Após a limpeza, pode ser aplicado um medicamento sobre a superfície afetada. Em seguida, é realizado um curativo, para proteger a área queimada de outras possíveis lesões, infecções e disseminação das mesmas. Como profilaxia, se necessário, um antibiótico é administrado, assim como, a vacina antitetânica, caso não esteja atualizada (THOMPSON; SKINNER; PIERCY, 2002).

Conforme Vale (2005), o atendimento à vítima de queimadura grave obrigatoriamente deve ser prestado em ambiente hospitalar e compreende quatro estágios em ordem cronológica: controle da função respiratória (permeabilidade das vias aéreas); rehidratação parenteral e vigilância do estado hemodinâmico; tratamento analgésico e acondicionamento do paciente na Unidade de Queimados.

2.5.4.2 O Curativo

No Brasil, muitos trabalhos mostram que os protocolos para tratamento de feridas provocadas por queimaduras podem variar de um nosocômio para outro e, os curativos têm sido realizados por profissionais de enfermagem, com base em uma rotina pré-estabelecida nos serviços especializados em queimaduras, sendo adotada a conduta cirúrgica quando atingem patamares elevados de severidade (FERREIRA et al., 2003; MARTINS; ANDRADE, 2007).

Atualmente, os agentes tópicos (soluções, cremes e produtos naturais), são as substâncias mais utilizadas nos curativos, podendo ou não ter ação antimicrobiana e também ajudar no desbridamento dos tecidos (GOMES; SERRA; MACIEIRA, 2001).

Têm sido demonstradas outras opções para os curativos: as pomadas enzimáticas e os Ácidos Graxos Essenciais (AGE), que são compostos por ácido linoléico, ácido caprílico, vitamina A, E e lecitina de soja. Além dos agentes tópicos, na atualidade, os produtos naturais como o mel e a papaína também têm-se mostrado eficazes no tratamento das queimaduras (FERREIRA et al., 2003).

Na atualidade tem-se buscado o desenvolvimento de novas tecnologias para a reparação e substituição do tecido humano, principalmente de pacientes que possuem grande área corpórea comprometida com queimaduras de segundo grau profunda e/ou de terceiro grau.

Entre os biomateriais que estão no mercado, existem alguns produtos que empregam na sua fabricação o processo de engenharia tecidual de alta tecnologia.

A engenharia de tecidos, preocupada em controlar o crescimento da matriz celular, desenvolve os implantes cutâneos que podem ser classificados em três tipos, como referem Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003b): matriz dérmica, matriz dérmica com células e uma estrutura com camada dupla.

Os autores citados destacam o *Integra*, cuja matriz de regeneração dérmica possui uma camada interna altamente porosa e composta por colágeno de origem bovina e glicosaminoglicano, que promove crescimento celular e síntese de colágeno. Sua camada externa é formada por uma membrana de silicone, que atua como barreira à infecção e proteção mecânica, sendo indicada em queimaduras e em feridas limpas.

Martinez et al. (2002) descreveram um experimento com o uso de derme artificial em cirurgia plástica pediátrica, no qual foi verificado que, “apesar das possíveis complicações, a manipulação fácil e os bons resultados fazem *Integra* um substituto de pele perfeito em várias desordens cutâneas”.

Mendes Júnior, Viterbo e Rosa (2007) sugeriram o *Biobrane*, membrana de silicone com nylon ligado a peptídeos do colágeno dérmico, como um substituto temporário, de curto prazo, semipermeável e com boa aderência e flexibilidade. Outro achado é o produto *CollatampFacie*, membrana de colágeno tipo 1, derivada de tendão de Aquiles de bovinos, associada a um equivalente epidérmico temporário.

Diversos estudos apontam novos produtos e tecnologias avançadas, porém, apesar dos resultados favoráveis em alguns trabalhos, ainda são impraticáveis nos serviços públicos de saúde devido aos altos custos, carecendo, portanto, de tratamentos eficazes, mas com custos reduzidos para atender a enorme demanda de queimados nas emergências.

O *Hidrogel* pode apresentar-se sob a forma de gel transparente, amorfo ou placa. As placas são geralmente compostas por água, propileno glicol e carboximetil celulose ou água e polivinilpirrolidona. O produto possui ação quimiotática para leucócitos, favorece a angiogênese, promove desbridamento autolítico e mantém o meio úmido ideal. Dentre os *hidrogels* comercializados atualmente no Brasil encontra-se: *Hydrosorb*, *Duoderm gel*, *Nu-gel*, *Intrasite gel*, *Dermagran*, *Hydrosorb Plus*, *Hypligel*, *Purilon* e *Elasto-gel*. A indicação desse recurso auxiliar é para queimaduras de primeiro e segundo grau.

Para Blanes (2004), reduz significativamente a dor, dando uma sensação refrescante, devido a sua elevada umidade que evita a desidratação das terminações nervosas. Ajuda na autólise, ou seja, amolece e hidrata tecidos desvitalizados, facilitando sua remoção. Em feridas livres de tecidos desvitalizados, propicia o meio ideal para a reparação tecidual.

Eisenbud et al. (2003) descrevem que, o *Hidrogel* encontra-se entre as muitas categorias de produtos avançados disponíveis hoje, devido ao seu custo, sua efetividade, por ser confortável e de fácil manuseio. Além disso, proporciona o controle da hidratação da superfície da ferida, promovendo a umidade e absorvendo o exsudato em excesso.

2.5.4.2.1 O Uso Tópico da Sulfadiazina de Prata a 1%

A sulfadiazina de prata a 1% é um antibacteriano amplamente utilizado topicamente em tratamentos de queimaduras.

Ferreira et al. (2003) pontuam que a sulfadiazina de prata a 1% é um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, sendo recomendada em lesões de segundo e terceiro grau. A droga é um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra infecções de germes gram-negativos e gram-positivos.

Candido (2006) refere-se à sulfadiazina de prata a 1% como uma pomada hidrofílica com características bactericidas imediatas e bacteriostáticas residuais, que provoca precipitação protéica e age diretamente na membrana citoplasmática bacteriana. O autor relata que o medicamento pode vir associado ao nitrato de cério e ao ácido hialurônico e, cita o Dermazine e o Pratazine como os principais produtos comercializados atualmente no país.

De acordo com Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003b) a sulfadiazina de prata 1% é um dos diversos recursos atualmente disponíveis para auxiliar no processo de cicatrização e na realização de curativos e técnicas para o tratamento de feridas, queimaduras, lesões infectadas ou com tecido necrótico.

2.6 Fototerapia com Luz Coerente (laser) e com Luz não Coerente (LED)

A tecnologia *laser* é considerada uma conquista tecnológica para a Medicina e Odontologia desde a década de sessenta principalmente no que se refere à terapia coadjuvante em reparo tecidual (GENOVESE, 2007).

No final da década de setenta surgiram os lasers de GaAs (Arseneto de Gálio) e GaAlAs (Arseneto de Gálio e Alumínio) em baixa potência (HERCH; TERESI, 1987), amplamente utilizados em diferentes áreas da saúde. Tanto os lasers quanto os LEDs utilizam os diodos GaAlAs, no entanto, os LEDs não possuem o

ressonador responsável pela emissão estimulada de radiação e amplificação da luz, emitindo portanto, luz através de emissão espontânea (KARU, 2003).

Em 1988, de acordo com Oshiro e Calderhead, a terapia foi denominada “*Low Level Laser Therapy*” ou LLLT, que significa terapia com laser de baixa potência ou TLBP. Na TLBP os efeitos gerados nos tecidos biológicos não são atribuídos ao aquecimento. Acredita-se que estes efeitos não térmicos sejam mediados por uma reação fotoquímica que altera a permeabilidade da membrana celular levando ao aumento da síntese de RNA e da proliferação celular (BAXTER, 1998).

O *laser* é utilizado na fisioterapia, principalmente na Europa, há aproximadamente trinta anos. A TLBP é amplamente utilizada devido aos efeitos terapêuticos observados clinicamente após sua utilização. Dentre os efeitos clínicos observados, evidenciam-se a analgesia local e ação antiinflamatória no tratamento de uma ampla variedade de dores agudas e crônicas, afecções musculoesqueléticas, edemas e lesões cutâneas, como úlceras de pressão e venosas, pé diabético e queimaduras (AGNE, 2005; ELWAKIL, 2007; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007; FRARE; NICOLAU, 2008; GÁL et al., 2009).

Os efeitos terapêuticos da radiação eletromagnética (coerente ou não coerente) no tecido biológico dependem fundamentalmente dos parâmetros empregados: comprimento de onda (λ), potência (W), energia (J), densidade de energia (J/cm^2 , fluência), densidade de potência (W/cm^2 , irradiância), número de sessões, etc (GENOVESE, 2007; BISPO, 2007).

Karu (1987) e Baxter (1997) consideram que no aspecto molecular podem ocorrer três fenômenos:

- Excitação das cadeias de elétrons nas mitocôndrias, gerada pelo espectro visível e infravermelho próximo. As moléculas excitadas têm um maior potencial para gerar reações químicas levando a um efeito observável em nível biológico;
- Vibrações moleculares, que causam deslocamentos dos núcleos atômicos, mas não afetam suas posições de equilíbrio, geradas pelo espectro infravermelho;
- Rotação da biomolécula total ou partes dela ao redor de um eixo, gerada pelo campo eletromagnético criado pela luz incidente, o que poderia levar a uma pequena elevação da temperatura que ainda não se sabe claramente se acontece em nível celular ou subcelular.

Para Peng et al. (2008), a escolha do comprimento de onda apropriado para uma dada aplicação depende: (a) das características de absorção do tecido (b) do comprimento de onda da radiação emitida (c) dos parâmetros temporais da energia entregue incluindo o nível de potência aplicado (densidade de potência), do total de energia entregue sobre uma dada área de superfície (densidade de energia) da taxa de duração da exposição (repetição de pulso) e (d) do modo do raio de energia ser entregue ao tecido alvo, ou seja, energia contínua pulsátil e contato direto ou sem contato com o tecido alvo.

2.6.1 Fototerapia com Luz Coerente

Estudos sobre os efeitos da TLBP sobre fibroblastos humanos foram realizados para investigar a fotobioestimulação (PBM) em nível celular (ALEXANDRATOU et al., 2002; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; HOURELD; ABRAHAMSE, 2007; HOURELD; ABRAHAMSE, 2008).

Em um estudo com ratos diabéticos, Carvalho et al. (2001) apontaram que, apesar da literatura demonstrar que o diabetes retarda e dificulta o processo de reparação tecidual, a utilização do laser promoveu resultados semelhantes em ambos os casos, com grande presença de tecido de granulação, intensa proliferação de fibroblastos e fibras colágenas e neo formação de vasos sanguíneos, o que sugere uma aceleração na reparação tissular. Em 2006, outro estudo demonstrou os efeitos do laser HeNe (632,8 nm) a 4 J/cm², pontuando que o grupo tratado com laser apresentou uma média de fibras colágenas maior e estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado, tanto para diabéticos, como não-diabéticos.

Em 2004, Byrnes et al. também investigaram os efeitos da fotobiomodulação na cicatrização de feridas cutâneas em um modelo animal com diabetes tipo II, utilizando um laser HeNe (632,8 nm), avaliando a expressão do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), a fim de elucidar o mecanismo da melhora na cicatrização de feridas. Melhoras significativas histológicas foram encontradas após o tratamento com 4 J/cm² no grupo de diabéticos, em comparação com o grupo dos não-diabéticos após a irradiação.

Borgguignon Filho et al. (2005) descreveram que, um dos primeiros trabalhos para avaliar os efeitos do *laser* na cicatrização de feridas foi realizado por Mester et al., em 1971, quando utilizaram um laser de rubi, com comprimento de onda de 694,3 nm e, doses de 0,5, 1, 4, 5 e 10 J/cm² para irradiar o dorso de ratos. Os autores concluíram que, a dose de 1 J/cm² apresentou melhores resultados em relação às outras doses utilizadas e, que o aumento do número de irradiações proporcionava a cicatrização mais rápida das lesões cutâneas.

Rocha Júnior (2006) e (2007) comprovou em seus dois trabalhos, importantes efeitos antiinflamatórios e analgésicos da TLBP. De acordo com seus achados, a terapia produz modificações moleculares e estruturais celulares, aumentando o número de fibroblastos e acelerando a reparação tecidual. Sobre os efeitos antiinflamatórios, destacaram a ativação de monócitos e macrófagos, o aumento da fagocitose, a proliferação acelerada de linfócitos na área da inflamação e a diminuição dos níveis de prostaglandina E2, tendo encontrado também, um incremento na vascularização.

Gál et al. (2006) avaliaram histologicamente o efeito da irradiação na cicatrização de feridas induzidas em ratos e concluíram que a terapia laser de baixa potência a 670 nm influencia positivamente todas as fases da cicatrização de feridas cutâneas de ratos.

Em 2007, Gonçalves et al. publicaram um estudo clínico sobre o benefício dos efeitos da irradiação com laser HeNe (632,8 nm), no processo de reparo da pele em camundongos tratados previamente com drogas antiinflamatórias esteróides ou não-esteróides. Os resultados mostraram que a terapia com laser HeNe pode influenciar o comportamento de diversos tipos de células inflamatórias, e que múltiplos efeitos podem ocorrer simultaneamente e acelerar a dinâmica da cicatrização.

Meirelles et al. (2008a), em um estudo comparativo sobre os efeitos da TLBP na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos, utilizando comprimento de onda de 660 e 780 nm, 35 mW de potência e dose de 5 J/cm², observaram elevada deposição de fibras colágenas, maiores volumes de tecido de granulação, menos edema, uma vigorosa reação inflamatória, e o aumento da revascularização em todos os animais tratados com laser, concluindo que, os dois comprimentos de onda foram eficazes na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos Wistar.

Alguns experimentos comprovaram os benefícios dos efeitos da fototerapia com *laser* em queimaduras, demonstrando que a cicatrização das feridas irradiadas foi mais rápida do que as não irradiadas, ocorrendo maior deposição de fibras colágenas, e angiogênese (RIBEIRO et al., 2004; MEIRELLES et al., 2008b). No entanto, trabalhos como os de Schlager (1999; 2000) não evidenciaram na análise macroscópica e histológica, nenhuma diferença estatisticamente significativa nos grupos irradiados em relação ao grupo controle durante o período de observação. Em um dos estudos foi utilizado um *laser* diodo 670 nm, com potência de 250 mW e fluência de 2 J/cm² e no estudo seguinte, um laser diodo 690 nm, potência de 30 mW, comparativamente ao laser 635 nm, potência de saída 12 mW, com a mesma densidade de energia de 1,5 J/cm² por 30 dias.

Trabalhos recentes sugerem que lesões na pele de ratos diabéticos e não diabéticos reparam-se mais rapidamente através da terapia com *laser* (BYRNES et al., 2004; MAIYA; KUMAR; RAO, 2005; CARVALHO et al., 2006; DALL- AGNOL et al., 2009; GUNGORMUS; AKIOL, 2009).

Genovese (2007) sugere que ao se aplicar um laser ou um LED, é necessário conhecer detalhadamente todos os seus parâmetros, como comprimento de onda, energia emitida ao tecido, densidade de energia, área do feixe, tempo de aplicação, potência de pico, potência média (em caso de aplicação pulsada) e densidade de potência, bem como as normas de segurança, que inclui a escolha de óculos de proteção que filtrem o comprimento de onda que será usado. Este cuidado com os parâmetros teria como função orientar o profissional que aplica a luz *laser* a reproduzir clinicamente os achados encontrados em ensaios experimentais.

Gonçalves et al., em 2009, descreveram um experimento sobre os efeitos do laser arseneto de gálio (GaAs, 4 J/cm²) e do laser de arseneto de gálio alumínio (GaAlAs, 30 e 60 J/cm²) com comprimento de onda de 830 nm, associado a pomada cicatrizante Dersani sobre os leucócitos sanguíneos de ratos Wistar. Concluíram que na contagem global de leucócitos nos diferentes tratamentos não houve diferença significativa. Na contagem diferencial, o grupo tratado com Dersani apresentou diferença significativa ao número de monócitos quando comparado aos outros grupos. Os grupos controle e os tratados com *laser* GaAlAs 30 J/cm² apresentaram aumento no número de neutrófilos.

2.6.2 Fototerapia com Luz não Coerente (LED)

Novas investigações sobre os efeitos de fontes de luz alternativas, como o diodo emissor de luz (LED), têm sido estimuladas pelo alto custo da emissão laser, por permitir a irradiação de uma área maior e requerer menos energia durante sua utilização (ERDLE et al., 2008). Bispo (2007) afirma que a nova geração de LEDs tem revelado resultados similares ou superiores em relação às lâmpadas halógenas convencionais, quando se compara a relação custo-benefício.

A radiação emitida por lasers perde sua propriedade de coerência nas primeiras camadas de tecido biológico (WHELAN et al., 2000). Desta forma, o emprego de fontes de luz não coerente têm sido amplamente investigada.

A tecnologia LED, com o passar dos anos, vem sendo empregada também no desenvolvimento de inúmeros produtos destinados à área médica, fisioterapêutica e odontológica

Estudos têm apontado os efeitos terapêuticos da luz emitida por LEDs na região visível do espectro eletromagnético, tanto em experimentos realizados *in vivo* como *in vitro* (MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, 2000).

Segundo Karu, em 2002, fontes de luz não coerentes já se encontravam em fase de sedimentação na área da saúde, já tendo ultrapassado as fases iniciais de investigação *in vitro*.

Smith (2005), professor emérito de radiação oncológica, fundador e primeiro presidente da *American Society for Photobiology da Stanford University School of Medicine*, refere que as fontes de luz não coerentes são menos onerosas que fontes de luz coerentes, sendo o comprimento de onda um dos parâmetros mais importantes na fototerapia.

Os LEDs emitem pouco calor, portanto, o risco de danos térmicos ao tecido é mínimo. Esta característica importante provocou sua aprovação, pelo FDA (*Food and Drug Administration*), para a utilização em pesquisa em seres humanos (WHELAN et al., 2003).

O uso de lasers como fonte de luz foi o grande passo no desenvolvimento tecnológico da terapia à luz, contudo, com a chegada do LED, os questionamentos não se voltam mais para o aspecto da fonte luminosa gerar efeitos biológicos ou não,

mas como a radiação atua em nível celular dos organismos e quais são os melhores parâmetros de aplicação (KARU, 2003). Para tanto, são necessárias novas pesquisas para se chegar a resultados mais seguros, confiáveis e reprodutíveis, considerando que mais estudos futuros em humanos devem ser realizados.

Pesquisas sobre os efeitos terapêuticos do LED ainda são bastante escassas na literatura, porém, alguns trabalhos recentes sugerem que lesões cutâneas e em tendões podem se reparar mais rapidamente através da terapia com LED, uma fonte de luz de menor custo e de fácil manuseio (DESMET et al., 2006; CORAZZA et al., 2007; CASALECHI et al., 2008).

Pesquisas em nível nacional caminham lentamente e poucos autores têm se reportado ao tema, no entanto, achados de alguns estudos (CORAZZA et al., 2007; LEITE et al., 2008; CASALECHI et al., 2008; LANG-BICUDO et al., 2008; SACONO et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009; MINATEL et al., 2009; LEAL JÚNIOR et al., 2009) ilustraram os efeitos positivos do LED no processo cicatricial, na reparação tendinosa, muscular e na prevenção da mucosite oral, contudo, não foram encontrados estudos associando a terapia com LED a terapias convencionais no processo de cicatrização de queimaduras.

Em um estudo de revisão sobre aplicações clínicas e experimentais da fotobiomodulação LED na região do infravermelho próximo, Desmet et al. (2006) pontuaram que a luz tratamento NIR-LED estimula o fotorreceptor citocromo C oxidase, resultando em um aumento e produção do metabolismo energético, além de estimular o metabolismo oxidativo mitocondrial *in vitro*, e acelerar a reparação de células e tecidos *in vivo*.

Os efeitos da terapia com LEDs policromáticos na cicatrização de queimaduras de ratos não diabéticos e diabéticos também foram relatados (AL-WATBAN; ANDRES, 2003), apontando que significativa estimulação foi observada nos ratos diabéticos em relação aos seus controles e aos não diabéticos. Estudos apontaram que lesões na pele de ratos diabéticos e não diabéticos repararam-se mais rapidamente através da terapia com LED (CORAZZA et al., 2007; ERDLE et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009).

Corazza et al. (2007), comparando os efeitos angiogênicos da luz emissora de diodo (LED) e do *laser* em feridas induzidas em ratos, com variadas fluências, concluíram que não houve diferença significativa entre as fontes de luz. Os

resultados demonstraram que nos dias 3, 7 e 14 a proliferação de vasos sanguíneos em todos os grupos irradiados foi superior em comparação às do grupo controle.

Lang-Bicudo et al. (2008) descreveram um estudo de caso no qual foi verificada a eficácia da terapia com LED para prevenir mucosite oral em um paciente com doença de Hodgkin, tratado com o esquema de quimioterapia ABVD (doxorubicina [Adriamycin], bleomicina, vinblastina e dacarbazina). A irradiação intraoral foi com um LED na região do infravermelho próximo (880 nm, 3.6 J/cm², 74 mW) por cinco dias consecutivos, a partir do dia 1 de quimioterapia. Os resultados mostraram que o paciente não desenvolveu mucosite oral durante os cinco ciclos de quimioterapia, e nem apresentou sintomas de dor.

Um estudo similar foi realizado por Sacono et al. (2008) que relataram importante redução da mucosite oral em grupos de hamsters tratados com LED (630 nm, 12 j/cm², 160 mW, 37s).

Em um estudo recente Minatel et al. (2009) utilizou um LED combinado (660 nm, 890 nm) para promover a cicatrização de úlceras diabéticas que não respondiam a outras formas de tratamento. Concluíram que a terapia LED promoveu estímulo da formação de tecido de granulação nas feridas tratadas.

Estudos realizados com terapia LED na região do infravermelho próximo (880 nm, 4J/cm², 40s) e vermelho (630 nm, 6J/cm², 30s) em úlceras venosas, demonstram que as feridas irradiadas apresentaram sinais de melhoria da irrigação local, além da formação de tecido de granulação e cicatricial mais rápido que controles (SILVA et al., 2009).

Em uma análise comparativa da ação da luz coerente (660 nm) versus luz não coerente (640 nm) para reparo de tecidos em ratos diabéticos, Dall-agnol et al. (2009) demonstraram que a irradiação promoveu, de forma semelhante, uma ligeira aceleração do processo de cicatrização quando comparada com a de um grupo não tratado, apesar de ter sido mais evidente nos animais dos grupos diabéticos.

Erdle et al., em 2008, observando os efeitos da luz vermelha contínua em reparação de feridas, concluíram que, o LED em 670 nm acelera o processo de reparação em pele de ratos após lesão incisional, porém não foi efetivo na cicatrização de queimaduras.

Achados de um estudo realizado por Leite et al. (2008) evidenciaram que a fototerapia seja por luz coerente (laser) quanto por luz não coerente (LEDs)

apresentam efeito bioestimulador da produção de colágeno nas úlceras de ratos induzidos a uma condição de estresse como a desnutrição protéico-energética. Para os pesquisadores, a propriedade de coerência da luz parece não ser determinante para desencadear um efeito fotoestimulador no tecido irradiado.

As pesquisas sobre os efeitos biológicos e fisiológicos do LED vêm abrangendo três níveis de investigação: *in vitro* e *in vivo* animais e seres humanos. No entanto, ainda não fornecem dados conclusivos a respeito dos parâmetros de irradiação, dando margem, portanto, a especulações. Essa nova tecnologia, empregada para tratamento de algumas lesões, por ser relativamente nova, ainda se encontra em fase de determinação de seus reais efeitos, aplicações e limitações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar macroscópica e histologicamente o processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos da raça Wistar, utilizando a terapia com LED (640 nm) comparativamente ao tratamento conservador, com o uso tópico de Sulfadiazina de prata 1% e a associação de ambas as terapias.

3.2 Objetivos Específicos

Análise dos diferentes grupos em 7 e 14 dias após uma lesão por queimadura quanto:

- Aspectos macroscópicos da lesão (área, crosta);
- Grau de reepitelização das feridas;
- Número de células inflamatórias, vasos neoformados e fibroblastos.

Mediante os resultados obtidos apontar a melhor conduta terapêutica, considerando os protocolos testados.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

A presente pesquisa tratou-se de um estudo do tipo longitudinal, prospectivo, de caráter quantitativo e de natureza experimental, baseada na técnica de observação direta, sistemática e intensiva, com análise de conteúdo, sobre os efeitos da irradiação LED (640 nm) e do uso tópico da substância Sulfadiazina de prata 1% no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau em ratos.

4.2 Aspectos Éticos

O estudo foi realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990), sendo cumpridas todas as exigências de conforto e bem-estar dos animais e obedecidos os princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme a Lei Federal nº 11.794, de 8/10/08.

O Projeto de Pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade Integral Diferencial (FACID) sob o Protocolo Nº 496/CEP/2008 (Anexo A).

4.3 Amostra

A amostra foi composta por 72 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem *Wistar*, com peso médio entre 200 e 250 gramas, provenientes do biotério da Faculdade Integral Diferencial (FACID), em Teresina-Pi, divididos aleatoriamente em seis grupos, conforme o tratamento realizado, como se segue:

- **Grupo 1** (n = 12): controle.
- **Grupo 2** (n = 12): sulfadiazina de prata 1%.
- **Grupo 3** (n = 12): LED pontual, em 4 pontos ao redor da queimadura (pontos cardinais), utilizando dose de 4 J/cm² em cada ponto (dose total de 16 J/cm²).
- **Grupo 4** (n = 12): LED sem contato com o dorso, queimadura irradiada por completo, em uma só aplicação, utilizando-se dose total igual ao grupo pontual.
- **Grupo 5** (n= 12): sulfadiazina de prata com LED pontualmente, em quatro pontos ao redor da queimadura, com dose de 4 J/cm² cada ponto, na borda da queimadura (em forma de cruz).
- **Grupo 6** (n = 12): sulfadiazina de prata com LED sem contato no dorso, utilizando a dose total de 16 J/cm² cobrindo toda a lesão.

Cada grupo de 12 animais foi dividido em dois subgrupos (A e B) de seis animais cada, conforme o período de observação, após o tratamento, de 7 e 14 dias, respectivamente, ao final dos quais os animais foram sacrificados e a pele da região de interesse do estudo, enviada para processamento e análise histológica.

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais, tratamento realizado e eutanásia.

Grupo (n=12)	Tratamento realizado	Eutanásia (dias)
1	Controle	7 e 14
2	Sulfadiazina tópica em toda a lesão	7 e 14
3	LED pontual - 4 J/cm ² em cada ponto	7 e 14
4	LED sem contato 16 J/cm ² cobrindo toda a lesão	7 e 14
5	LED + sulfa contato pontual - 4 J/cm ² em cada ponto	7 e 14
6	LED sem contato + sulfa - 16 J/cm ² cobrindo toda a lesão	7 e 14

4.4 Anestesia

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados, com a administração, por via intramuscular, de cloridrato de quetamina a 10%, na dose de 0,1 ml para cada 100g de peso corpóreo, associada à mesma dose de cloridrato de xilazina a 2%. As drogas anestésicas foram aplicadas de forma independente, com a utilização de seringas de 1 ml de capacidade e agulhas de 8 x 0,30 mm. Esse procedimento anestésico foi adotado como padrão no presente estudo.

4.5 Depilação

Após a anestesia foi realizada a depilação da região do dorso dos animais, posicionados em decúbito dorsal, cuja extensão foi de 6 cm de comprimento e 4 cm de largura (Figura 8).

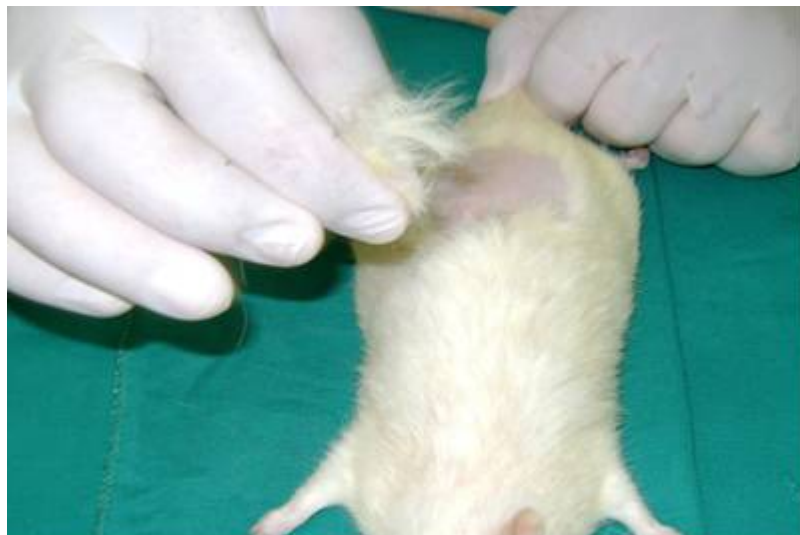


Figura 8: Depilação do dorso do animal 6 cm (sentido crânio-caudal) x 4 cm (sentido látero-lateral).

4.6 Indução da Queimadura Experimental

Para a realização da queimadura na pele do animal foi utilizado um tubo de ensaio de 2,44 cm de diâmetro, contendo 50 ml de água destilada aquecida, em estado de ebulição (100° C), e tempo de contato do instrumento com a pele de 20 segundos (Figuras 9 e 10). Após os procedimentos, os animais ficaram acomodados em gaiolas de polipropileno e mantidos durante todo o experimento em condições ideais de higiene, iluminação e temperatura, e alimentados com dieta padrão do biotério (ração Labina TM) e água “*ad libitum*”.



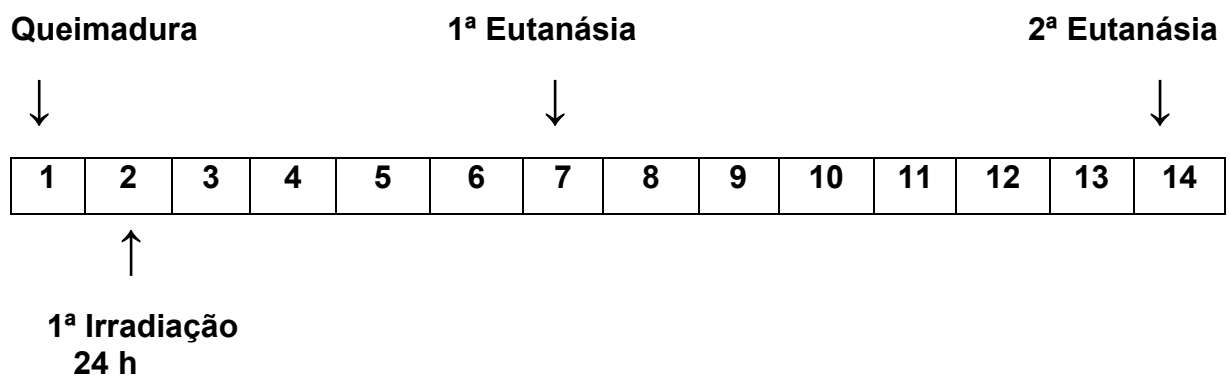
Figura 9: Fotografia ilustrativa do aquecimento da água.



Figura 10: Fotografia ilustrativa da indução da queimadura.

4.7 Fototerapia com LED

As primeiras irradiações com LED ocorreram 24 horas após a indução da queimadura, com intervalos de 48 horas nos grupos 3, 4, 5 e 6. Para as irradiações dos grupos 4 e 6 (sem contato), o LED foi fixado em um tripé (Figura 11), a uma distância de 2,44 cm do dorso do animal, como estratégia de padronização da densidade de energia aplicada. O tratamento estendeu-se até a véspera do sacrifício dos animais. Os animais do subgrupo A (sacrifício no 7º dia) receberam 3 irradiações de $16\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto que os animais do grupo B (sacrifício no 14º dia), receberam 6 irradiações de $16\text{J}/\text{cm}^2$.



Os parâmetros de irradiação com LED utilizados no presente estudo foram os descritos na Tabela a seguir:

Tabela 2: Parâmetros de irradiação com LED utilizados no experimento.

Parâmetros	LED Contato	LED Sem Contato
Comprimento de onda	640 nm	640 nm
Potência	110 mW	110 mW
Densidade de Energia	4 J/cm ² /ponto	16 J/cm ²
Área de Irradiação	1,13 cm ²	4,67 cm ²
Tempo de Irradiação	41 seg	680 seg (11' 33 ")
Energia	4,51 J	4,51 J
Distância LED/Pele	-	2,44 cm

O equipamento LED (640 nm) utilizado no experimento foi um protótipo desenvolvido no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), especificamente para este estudo. Antes de sua utilização o aparelho foi submetido a uma criteriosa aferição da sua potência, através do dispositivo Integrated 2-Watt Broadband Power and Energy Meter System - 13 PEM 001/J (Melles Griot Photonics Components Group - Carlsbad, California 92011, USA).



Figura 11: Irradiação com LED sem contato, atingindo toda a área da lesão.

O grupo controle, apesar de não ter se submetido à fototerapia foi manipulado de forma semelhante, a fim de minimizar possíveis vieses nos resultados da pesquisa.

O uso de luvas, máscaras e óculos especiais foi necessário para que fossem cumpridas todas as medidas de segurança e de proteção durante o experimento.

4.8 Uso Tópico da Sulfadiazina de Prata

Os grupos, 2, 5 e 6 receberam aplicação de Sulfadiazina de prata 1% a cada 48 horas, estendendo-se também até a véspera da eutanásia. A aplicação tópica da substância ocorreu manualmente, cobrindo toda a área da lesão com luvas individuais para cada animal, no intuito de evitar possíveis infecções.

4.9 Análise Macroscópica

As áreas das lesões foram registradas imediatamente após a sua produção, no 7º e 14º dias de tratamento, para os grupos experimentais. Para determinação da área da ferida e dos seus aspectos macroscópicos foi capturada a imagem digital com uma câmera marca Sony, resolução de 7,2 Mpixels fixada em tripé, mantida a uma distância constante de 12 cm da base (Figura 12).

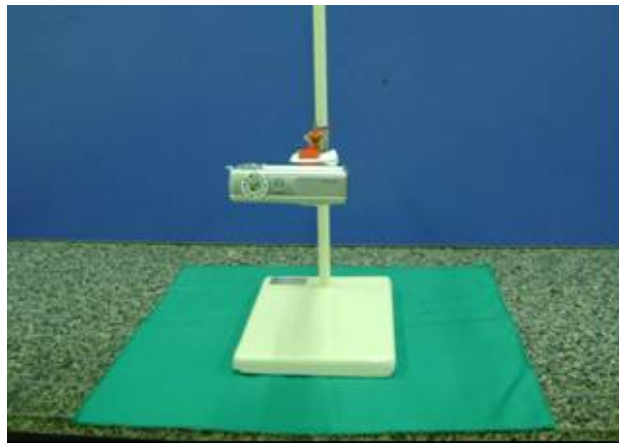


Figura 12: Posicionamento da câmera digital para a captura das imagens.

A análise do diâmetro da lesão foi realizada através do programa ImageJ, obedecendo as seguintes etapas (Figuras 13 e 14):

1 - Calibração do Programa - utilizaram-se na sequência os comandos: *File, Open, Reta, Analyze, Set Scale*.

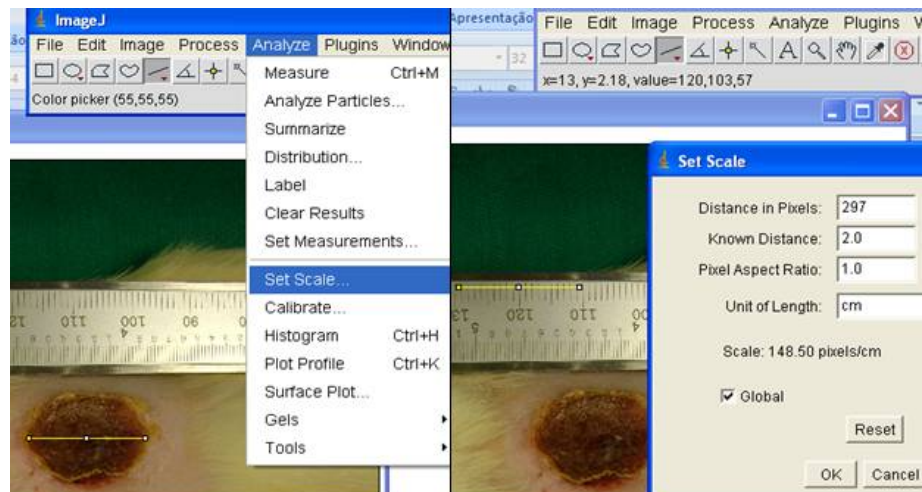


Figura 13: Calibração do Programa ImageJ.

2 - Determinação da Área da Lesão - utilizaram-se na sequência os comandos: *selections – fit ellipse, Measure (Control + M)*.

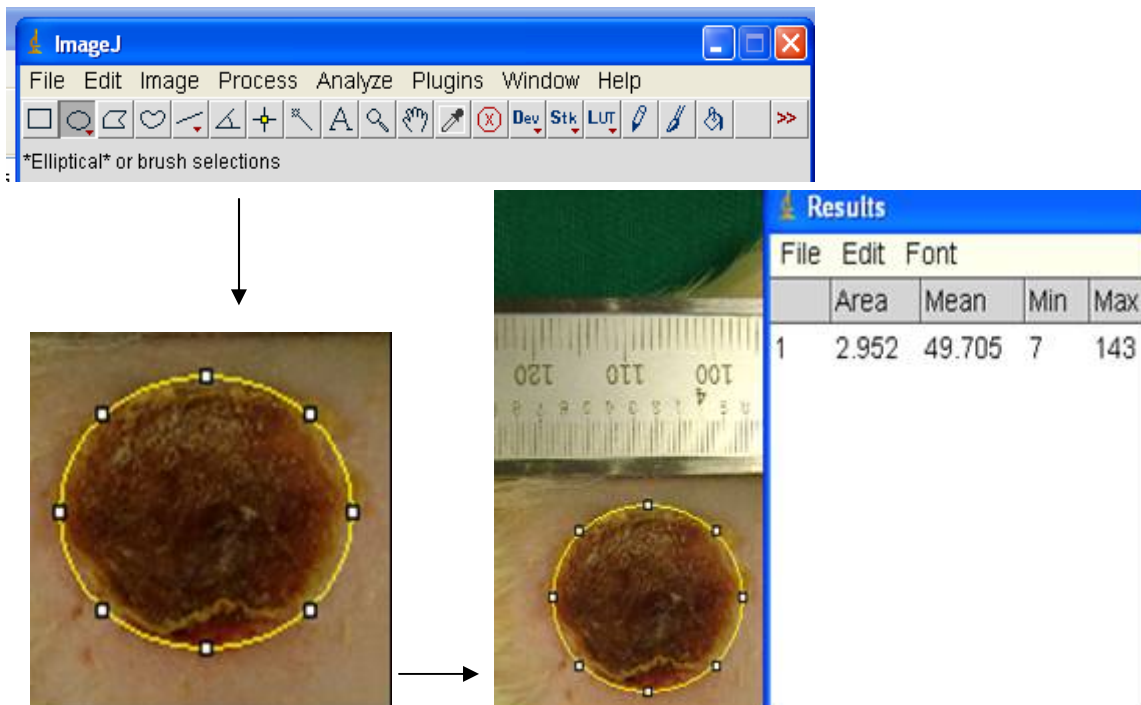


Figura 14: Determinação da área da lesão.

4.10 Análise Histológica

A peça anatômica foi retirada com um bisturi estéril no 7^o e no 14^o dias, com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, sendo identificada e codificada cada peça isoladamente, e afixadas em formol a 10% (Figura 15). Os animais estavam sob anestesia geral (ketamina 10 mg/kg + xilazina 20 mg/kg, intra-muscular) e as amostras de pele foram enviadas para o processamento histológico e análises histológica e histomorfométrica. Posteriormente foram então submetidos à eutanásia por superdosagem de anestésicos, após os procedimentos.

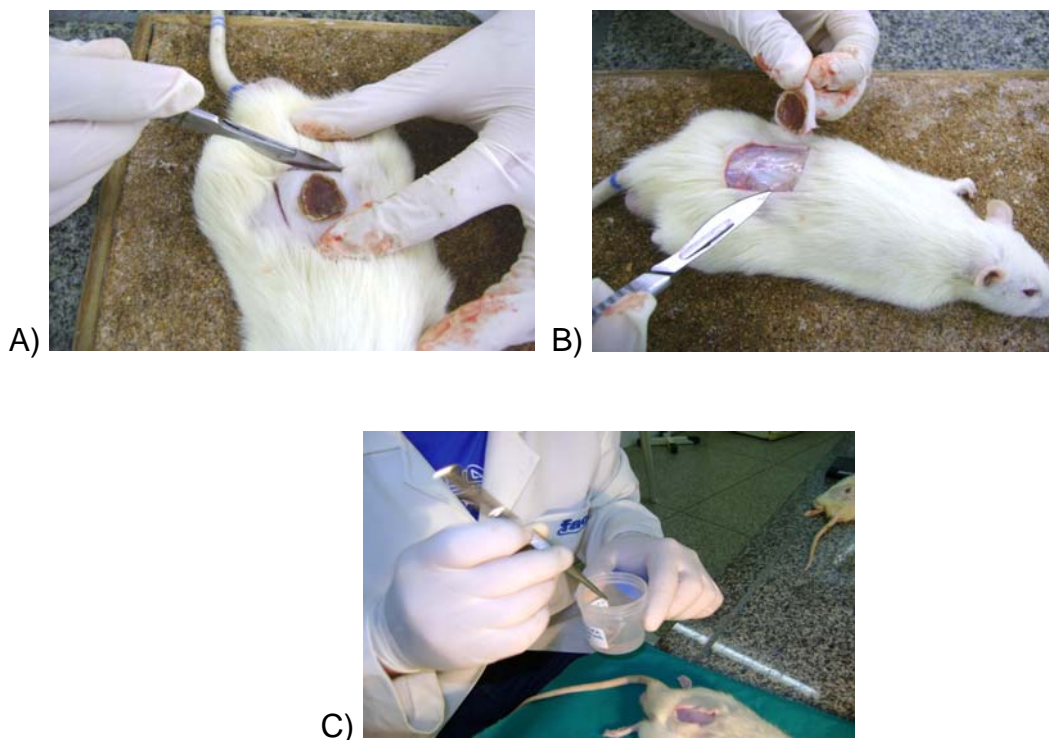


Figura 15: Procedimento cirúrgico para obtenção das amostras de pele da área de estudo. (A) Incisão. (B) Excisão da peça anatômica. (C) Material fixado em formol 10%.

O processamento histológico das lâminas foi realizado no Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME), da Universidade Estadual do Piauí (UESPI).

As lâminas foram numeradas de acordo com o número do animal e

subgrupo a que pertencia. A partir do material fixado em formol a 10%, durante 24 horas, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações de etanol (70 a 100%), apuradas em xilol e emblocadas em parafina, de acordo com as etapas de rotina dos métodos histológicos.

As amostras foram submetidas a cortes histológicos longitudinais, com secções de 5 µm de espessura. Foram obtidos 8 cortes por animal, sendo 4 cortes corados com Hematoxilina e Eosina e 4 cortes corados com Tricrômico de Masson, este último usado para coloração específica do colágeno.

A análise histológica processou-se através de microscopia óptica e os resultados, registrados por uma análise qualitativa da reação inflamatória, definida por: presença de células inflamatórias, fibroblastos, neovascularização e deposição de colágeno, seguindo os critérios histológicos mostrados no Quadro 1:

Quadro 1: Critérios para análise histológica por microscopia óptica.

Critério		Marcação	
Reepitelização	Ausente	Presente Recobrimdo < 50% da ferida presente Recobrimdo > 50% da ferida Presente Recobrimdo 100% da ferida com espessura irregular	
Inflamação Aguda	Discreta Presença de < 25% de neutrófilos entre as células presentes na área correspondente a ferida	Moderada Presença de 25-50% de neutrófilos entre as células presentes na área correspondente a ferida	Intensa Presença de > 50% de neutrófilos entre as células presentes na área correspondente a ferida
Inflamação Crônica	Discreta Presença de < 25% de células inflamatórias crônicas na área correspondente a ferida	Moderada Presença de 25-50% de células inflamatórias crônicas na área correspondente a ferida	Intensa Presença de > 50% de células inflamatórias crônicas na área correspondente a ferida
Inflamação Mista	Discreta Presença de < 25% de leucócitos mono e polimorfonucleares na área correspondente a ferida	Moderada Presença de 25-50% de leucócitos mono e polimorfonucleares na área correspondente a ferida	Intensa Presença de > 50% de leucócitos mono e polimorfonucleares na área correspondente a ferida
Tecido de Granulação	Discreta Discreta presença de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias	Moderada Moderada presença de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias	Intensa Intensa presença de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias
Neovascularização	Discreta Quantidade de neovasos menor do que observado no tecido adjacente saudável	Moderada Quantidade de neovasos similar do que observado no tecido adjacente saudável	Intensa Quantidade de neovasos maior do que observado no tecido adjacente saudável
Presença de Fibroblastos	Discreta Presença de < 25% de fibroblastos jovens e menos diferenciados que outros tipos celulares	Moderada Presença de 25-50% de fibroblastos jovens e menos diferenciados que outros tipos celulares	Intensa Presença de > 50% de fibroblastos jovens e menos diferenciados que outros tipos celulares
Fibras Colágenas	Discreta Menos marcado por picrossirius vermelho que o tecido adjacente saudável	Moderada Marcação por picrossirius vermelho similar ao tecido adjacente saudável	Intensa Mais marcado por picrossirius vermelho que o tecido adjacente saudável

4.11 Morfometria e Histomorfometria

As lâminas histológicas foram submetidas à análise através de imagens capturadas e avaliadas por um sistema de microscopia óptica, no Laboratório de Histologia da Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Getúlio Vargas (HGV), em Teresina - Piauí. A captura das imagens foi efetuada a partir de uma câmera digital da marca Samsung Super Vision SVIII, com resolução de 1280 X 1024 pixels, acoplada a um Microscópio Nikon Eclipse E 400 (*Japan*) e um computador Samsung Synmaster 740n. A Figura 16 mostra o equipamento utilizado.

Para o processo de quantificação das células inflamatórias, fibroblastos, colágeno e neovascularização, foram digitalizados quatro campos por corte, sendo 4 cortes por lâmina, duas lâminas por animal. As imagens foram padronizadas de acordo com a intensidade da luz do microscópio e altura do condensador (com objetiva de 40 vezes) e armazenadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*) para posterior contagem de células.

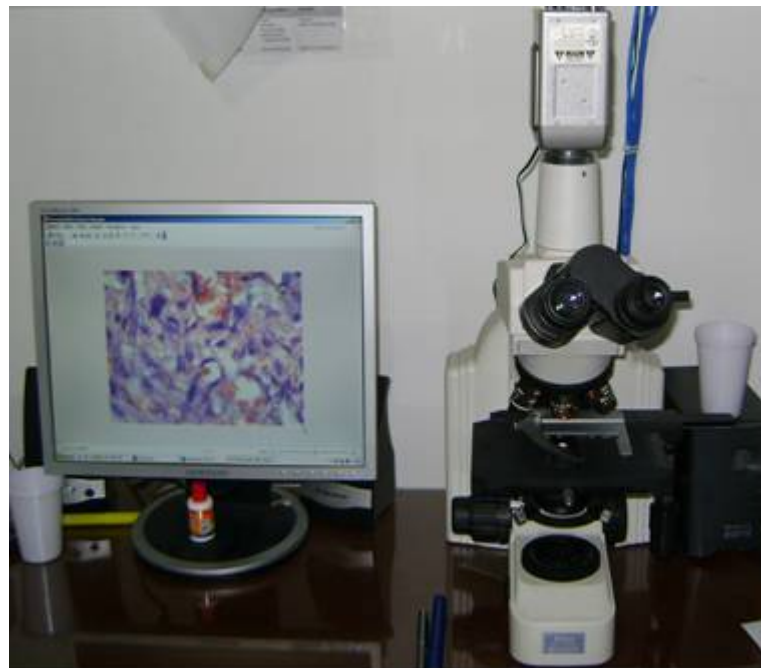


Figura 16: Equipamentos de captura digital - Câmera digital (Samsung Super Vision SVIII, 1280 X 1024 pixels), Microscópio (Nikon Eclipse E 400), computador (Samsung Synmaster 740n)

Microscopicamente foram analisados parâmetros quantitativos e qualitativos. A análise quantitativa compreendeu a contagem diferenciada de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos nos períodos de observação (7 e 14 dias), utilizando-se o programa ImageJ. Através do contador manual as células foram contadas uma a uma, de forma que, ao clicar o botão do mouse sobre cada estrutura celular o programa fornecia o total correspondente de células das áreas selecionadas. Na avaliação qualitativa foi analisada a evolução do reparo das lesões pela gradação do remodelamento das fibras de colágeno utilizando o mesmo software (Figura 17).

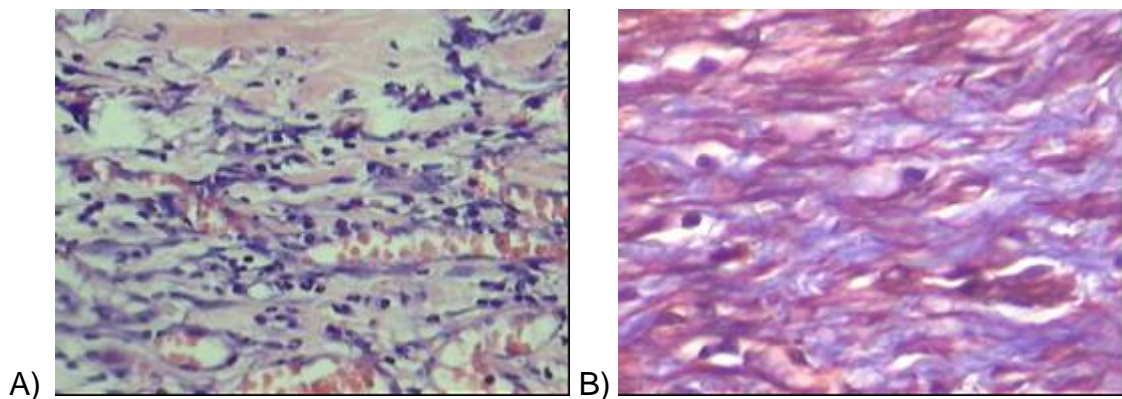


Figura 17: Fotografias ilustrativas da análise microscópica. A) e B) Imagens digitais de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (7 dias) e Tricrômico de Masson, (14 dias) respectivamente, utilizando objetivas de 40x.

A gradação do remodelamento das fibras de colágeno apresentou variações de acordo com o período e com os grupos analisados, apresentando pequenas variações entre os animais de cada grupo, nesse caso, os resultados expressam a média de gradação do remodelamento. Considerou-se para análise da evolução do reparo tecidual os seguintes critérios de graduação:

Grupo 1 (+): Significa ausência de remodelação. Corresponde ao quadro de hiper celularidade, associada a fibras colágenas esparsas sem orientação específica em relação às margens da área lesionada e presença de células inflamatórias crônicas.

Grupo 2 (++): Significa remodelação inicial. Corresponde ao quadro de hiper celularidade, associada a fibras colágenas espessas com orientação relativa em relação às margens da área lesionada e presença de células inflamatórias crônicas.

Grupo 3 (+++): Significa remodelação intermediária. Corresponde ao quadro de celularidade próxima do normal, associada a fibras colágenas maduras, dispostas em feixes, orientadas em relação às margens da área lesionada, com presença reduzida de células inflamatórias crônicas.

Grupo 4 (++++): Significa remodelação completa. Corresponde ao quadro de celularidade normal, associada a fibras colágenas maduras, orientadas em paralelo, com as margens da área lesionada, sem presença de células inflamatórias crônicas.

De acordo com Mandarim-de-Lacerda (2003), um conjunto de ações é necessário para quantificar estruturas morfológicas adequadamente (sem viés e de modo reprodutível), amostragem correta, cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos, ferramentas estereológicas atualizadas. Usando corretamente a estereologia pode-se realizar estudos quantitativos com pouco esforço: eficiência em estereologia significa contar uma amostra de cortes mínima, gastando pouco, mas com boa acurácia.

4.12 Análise Estatística

Todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.0 (Plataforma Windows, versão 3.0). Foi realizada a análise da diferença entre os grupos empregando-se o teste ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 5 % ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Macroscópica da Área de Lesão

As áreas de lesões foram obtidas através de fotografias imediatamente após a sua produção, no 7^o e 14^o dias de tratamento, para os grupos experimentais. Esta observação permitiu avaliar a evolução do reparo tecidual ao término do período experimental nos diferentes grupos pesquisados. Na Tabela 3 podem ser observados valores de média e desvio padrão dos diferentes grupos e momentos experimentais.

Tabela 3: Área da lesão (cm²) em 7 e 14 dias nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Dias	
	7	14
Controle	2,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3
Sulfa	1,8 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3
LED contato	2,7 \pm 0,7	0,3 \pm 0,2
LED sem contato	3,3 \pm 0,4	0,8 \pm 0,4
LED contato + Sulfa	2,1 \pm 0,6	0,5 \pm 0,5
LED sem contato + Sulfa	2,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2

Através da análise de variância (ANOVA) foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos (Figura 18).

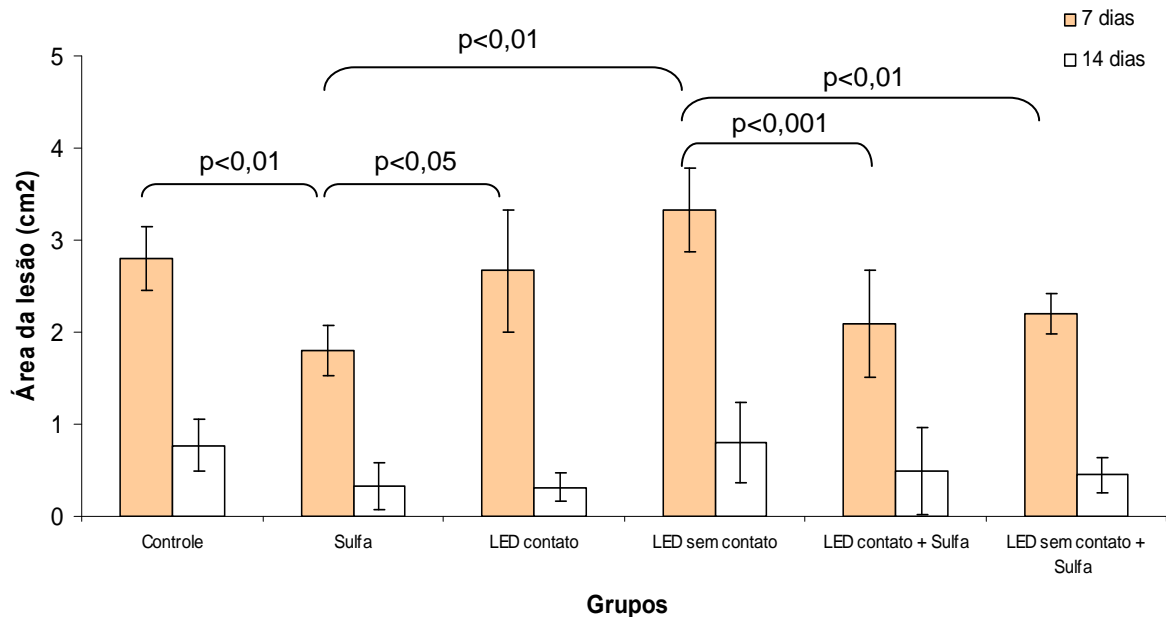


Figura 18: Área de lesão dos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Conforme demonstrado na Figura 18 a análise de variância realizada constatou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos aos 7 dias, porém não revelou diferenças aos 14 dias.

O grupo controle 7 dias apresentou uma área de lesão ($2,8 \pm 0,3 \text{ cm}^2$) significativamente ($p < 0,01$) maior que o grupo sulfadiazina de prata ($1,8 \pm 0,3 \text{ cm}^2$).

Quando se comparou o grupo sulfadiazina com o grupo LED contato pontual, constatou-se diferença significativa, revelando também a supremacia da sulfa aos 7 dias ($p < 0,05$) sobre o LED contato, onde observou-se lesões de $1,8 \pm 0,3$ e $2,7 \pm 0,7 \text{ cm}^2$ respectivamente. Tal diferença não foi observada estatisticamente aos 14 dias.

Observou-se também uma diferença estatisticamente significativa na redução do diâmetro das feridas ao se comparar a sulfadiazina de prata com o LED sem contato com um nível de significância $< 0,01$, cujas médias representam $1,8 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ e $3,3 \pm 0,4 \text{ cm}^2$ respectivamente.

Ao se observar o LED sem contato ($3,3 \pm 0,4 \text{ cm}^2$) com o LED contato + sulfa ($2,1 \pm 0,6 \text{ cm}^2$) verificou-se que o segundo foi significativamente superior ($p < 0,001$). Fato semelhante ocorreu quando se comparou o LED sem contato com o LED sem contato + sulfa ($2,2 \pm 0,2 \text{ cm}^2$), revelando que o LED, associado à sulfa,

apresentou-se como um tratamento superior em relação à dimensão da lesão, quando comparado aos demais tratamentos.

Constatou-se que a velocidade na redução da ferida foi superior em relação aos tratamentos em que se utilizou sulfadiazina de prata aos 7 dias, posto que aos 14 dias as lesões tinham, estatisticamente, as mesmas dimensões.

5.2 Análise Histológica

Sete dias após a queimadura ainda se observava necrose térmica que se estendia até o tecido subcutâneo homogeneamente e crostas foram observadas em todos os espécimes dos seis grupos (controle, sulfadiazina, LED pontual, LED sem contato, LED + sulfa pontual e LED + sulfa sem contato). Inflamação aguda e neovascularização foram intensas na maioria dos espécimes analisados (Figura 19) e a inflamação crônica foi principalmente moderada nesta fase.

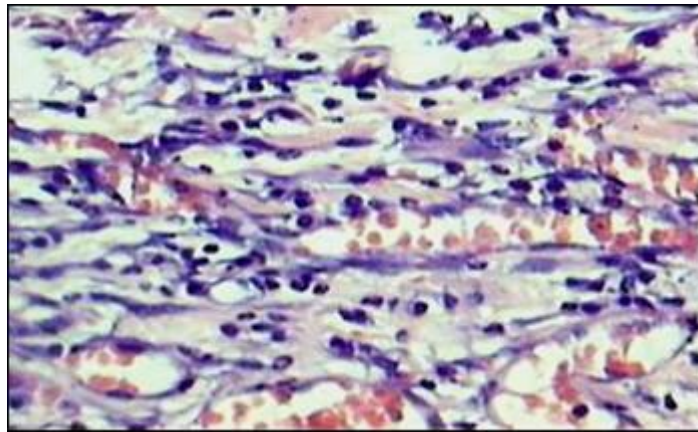


Figura 19: Fotomicrografia do grupo LED sem contato + sulfa, 7 dias pós-lesão. Inflamação aguda e neovascularização intensas. Coloração-Hematoxilina e Eosina - 400X.

A reepitelização esteve ausente em quase todas as amostras analisadas. A presença de tecido de granulação foi moderada em todos os espécimes do grupo controle e discreta na maioria dos animais dos outros grupos. O número de

fibroblastos foi discreto na maioria dos animais dos grupos experimentais. Em todos os animais a deposição de colágeno também foi discreta nesta fase (Figura 20).

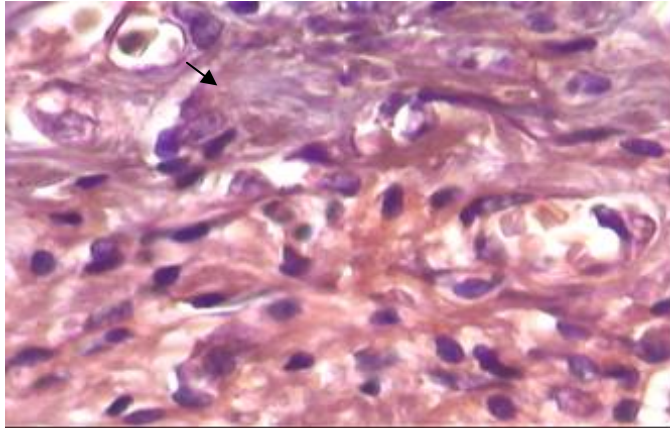


Figura 20: Fotomicrografia do grupo sulfa, 7 dias pós-lesão. Discreta deposição de fibras colágenas (seta). Coloração - Tricrômico de Masson - 400X.

No 14^o dia pós-queimadura, crostas ainda foram observadas em quase todos os animais (Figura 21) e os níveis de inflamação aguda variaram do discreto ao moderado.

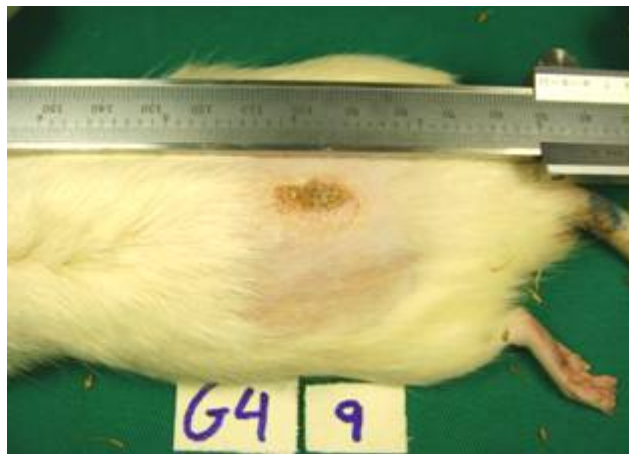


Figura 21: Fotografia ilustrativa mostrando a presença de crosta em um animal do grupo LED sem contato, 14 dias pós-lesão.

Nesta fase, a inflamação crônica foi predominantemente discreta nos grupos LED pontual e LED + sulfa pontual. Nos grupos LED + sulfa sem contato e controle foi moderada e nos demais grupos variou do discreto ao moderado. Inflamação mista foi moderadamente presente na maioria dos espécimes. Tecido de granulação foi moderado no grupo sulfadiazina e marcadamente intenso nos demais grupos. Neovascularização foi intensa em quase todos os espécimes. Um número moderado de fibroblastos foi evidenciado nos grupos controle e LED pontual, moderado a intenso no grupo LED sem contato e intenso nos grupos sulfadiazina, LED + sulfa pontual e LED + sulfa sem contato (Figura 22).

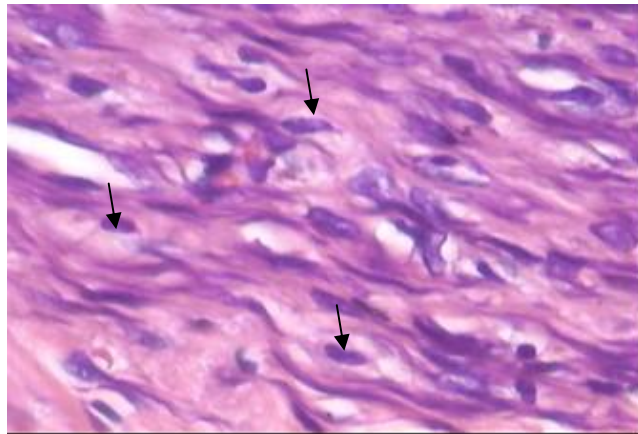


Figura 22: Fotomicrografia do grupo LED contato + sulfa, 14 dias pós-lesão. Intensa quantidade de fibroblastos (seta). Coloração - Tricrômico de Masson - 400X.

A deposição de colágeno foi marcadamente discreta na grande maioria dos animais (Figura 23). Reepitelização foi predominantemente discreta nos grupos LED sem contato e LED + sulfa sem contato, variou de discreta a moderada nos grupos controle e LED pontual e de moderada a intensa nos grupos sulfadiazina e LED + sulfa pontual

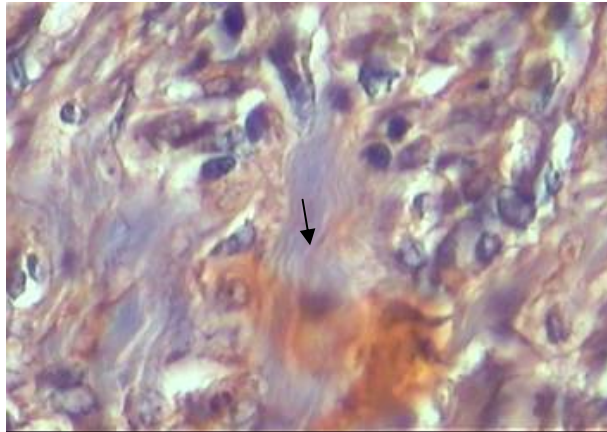


Figura 23: Fotomicrografia do grupo LED contato + sulfa, 14 dias pós-lesão. Discreta quantidade de colágeno (seta). Coloração - Tricrômico de Masson - 400X.

5.3 Análise Histomorfométrica

A análise estatística dos valores histomorfométricos obtidos de todos os grupos experimentais em estudo possibilitou avaliar a evolução do reparo das lesões através da quantificação das células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos (Tabelas 4 a 6 e Figuras 24 a 26).

5.3.1 Contagem de Células Inflamatórias

Pela análise de variância (ANOVA) constatou-se diferença significativa entre os tratamentos. O pós-teste de Tukey revelou as distinções entre o grupo controle e a sulfadiazina de prata, tanto aos 7 dias ($p < 0,05$), quanto aos 14 dias ($p < 0,001$), conforme mostram a Tabela 4 e a Figura 24. O número de células inflamatórias no grupo controle aos 7 ($39,4 \pm 3,0$) e aos 14 dias ($28,0 \pm 1,8$) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que no grupo sulfa ($26,6 \pm 7,7$ e $17,0 \pm 4,6$, 7 e 14 dias respectivamente).

Observando ainda o grupo controle verificou-se que o número de células inflamatórias ($39,4 \pm 3,0$) foi superior aos 7 dias quando comparado ao grupo LED sem contato ($22,7 \pm 7,9$) e ao grupo LED sem contato + sulfa ($21,6 \pm 8,3$) com p-valor ($< 0,01$) e ($< 0,05$), respectivamente.

Comparando o LED sem contato ($22,7 \pm 7,9$) e o LED contato + sulfa ($40,2 \pm 9,0$) observou-se um menor número de células inflamatórias para o primeiro grupo aos 7 dias ($p < 0,05$).

Finalmente, ao se comparar o LED contato + sulfa com o LED sem contato + sulfa ($21,6 \pm 8,3$), verificou-se que o segundo apresentou um menor número de células inflamatórias neste período de observação ($p < 0,05$).

Tabela 4: Número de células inflamatórias presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Dias	
	7	14
Controle	$39,4 \pm 3,0$	$28,0 \pm 1,8$
Sulfa	$26,6 \pm 7,7$	$17,0 \pm 4,6$
LED contato	$33,4 \pm 8,0$	$33,3 \pm 9,5$
LED sem contato	$22,7 \pm 7,9$	$29,7 \pm 7,9$
LED contato + Sulfa	$40,2 \pm 9,0$	$24,8 \pm 4,9$
LED sem contato + Sulfa	$21,6 \pm 8,3$	$26,5 \pm 12,2$

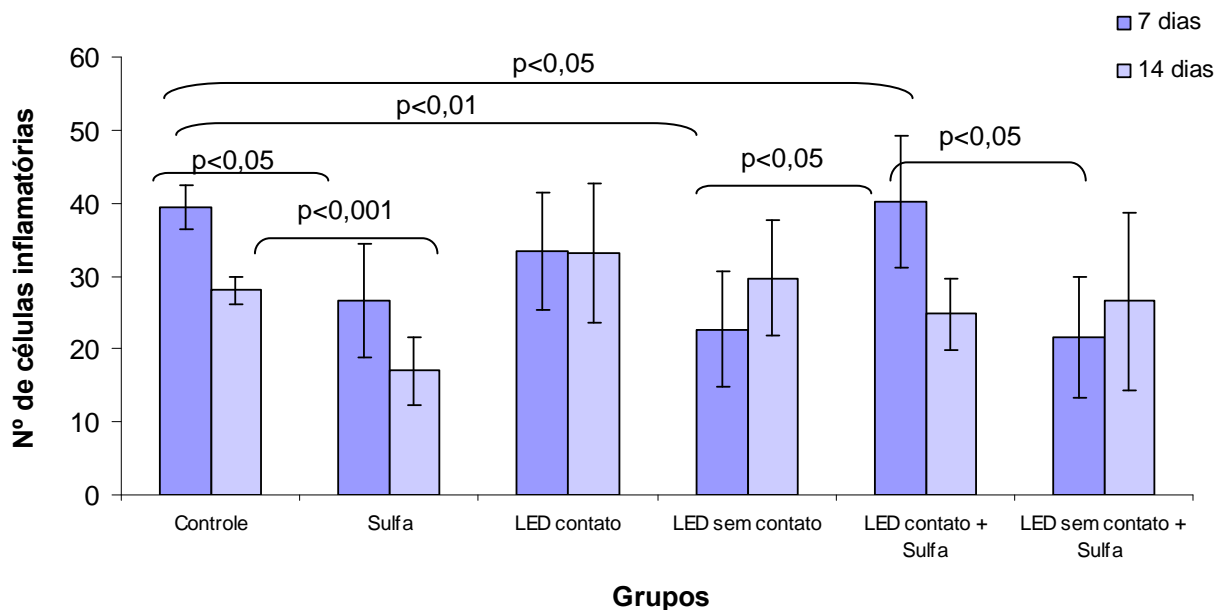


Figura 24: Número de células inflamatórias presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

5.3.2 Contagem de Vasos Sanguíneos

Na Tabela 5 e na Figura 25 é apresentado o número de vasos sanguíneos encontrados em cada região analisada nos grupos experimentais.

Analisando-se os grupos de tratamento com sulfadiazina ($2,4 \pm 1,1$) e LED contato ($2,0 \pm 1,0$) observou-se que aos 14 dias o LED contato apresentou um número menor de vasos sanguíneos, com nível de significância $p < 0,01$, entretanto, ao se comparar o grupo sulfa com o grupo LED sem contato ($5,8 \pm 2,3$) o número de vasos foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabela 5: Número de vasos sanguíneos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Dias	
	7	14
Controle	$4,6 \pm 1,3$	$4,0 \pm 1,0$
Sulfa	$3,4 \pm 2,4$	$2,4 \pm 1,1$
LED contato	$4,0 \pm 2,1$	$2,0 \pm 1,0$
LED sem contato	$4,8 \pm 3,4$	$5,8 \pm 2,3$
LED contato + Sulfa	$3,2 \pm 1,9$	$3,6 \pm 1,5$
LED sem contato + Sulfa	$2,2 \pm 1,1$	$3,4 \pm 1,5$

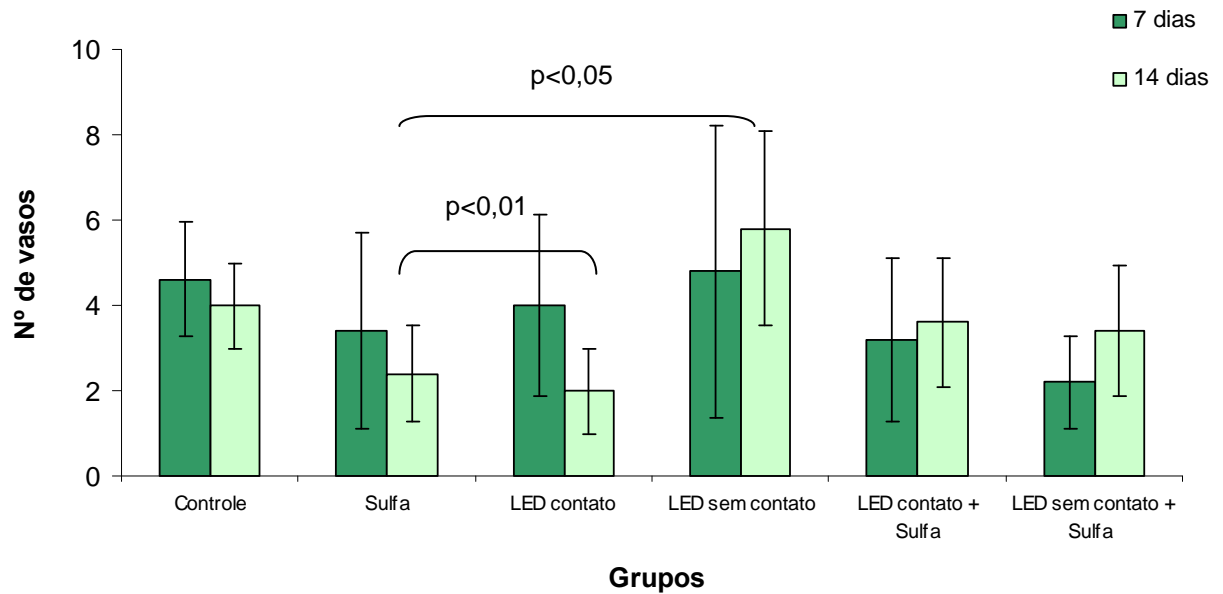


Figura 25: Número de vasos sanguíneos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

5.3.3 Contagem de Fibroblastos

A Tabela 6 e a Figura 26 mostram os dados obtidos na contagem de fibroblastos nos grupos controle, sulfa, LED contato, LED sem contato, LED contato + sulfa e LED sem contato + sulfa.

Na análise estatística dos grupos sulfa ($14,2 \pm 5,7$) e LED sem contato + sulfa o número de fibroblastos aos 7 dias foi maior neste último ($21,2 \pm 3,8$), demonstrando que o tratamento com LED associado à sulfa foi superior à sulfa sozinha. Os demais tratamentos não diferiram entre si, portanto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabela 6: Número de fibroblastos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Dias	
	7	14
Controle	20,0 \pm 3,8	24,2 \pm 4,4
Sulfa	14,2 \pm 5,7	29,0 \pm 4,2
LED contato	19,7 \pm 4,5	22,2 \pm 8,8
LED sem contato	18,0 \pm 4,9	26,0 \pm 3,9
LED contato + Sulfa	19,4 \pm 5,6	27,7 \pm 6,0
LED sem contato + Sulfa	21,2 \pm 3,8	21,4 \pm 6,3

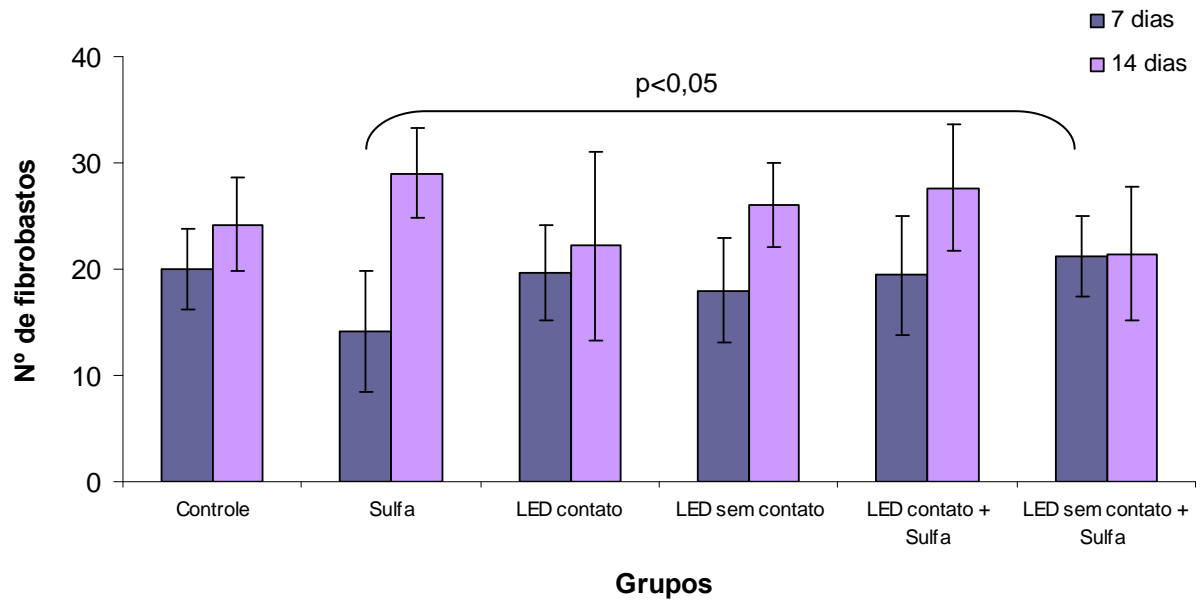


Figura 26: Número de fibroblastos presentes nos diferentes grupos em 7 e 14 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos da luz coerente e não coerente na cicatrização de queimaduras em ratos diabéticos e não diabéticos e em humanos, foram relatados em vários estudos (SCHLAGER et al., 1999; SCHLAGER et al., 2000; AL-WATBAN; ANDRES, 2003; GAIDA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2004; AL-WATBAN; DELGADO, 2005; ERDLE et al., 2008; MEIRELES et al., 2008a; MEIRELES et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2008).

Pesquisas sobre a terapia com LED associada à sulfadiazina de prata em queimaduras não foram encontradas na literatura, no entanto, alguns trabalhos recentes (CAMPOS JR. et al., 2007; GONÇALVES et al., 2007; SOMMER, 2007; ASHEGANI et al., 2008; REIS et al., 2008; GÁL et al., 2009) sugeriram a associação da luz coerente de baixa potência a outros fármacos (antibacterianos, antiinflamatórios esteróides e não esteróides).

O presente estudo objetivou analisar clínica e histologicamente o processo de cicatrização de queimaduras em ratos, utilizando a terapia com LED (640 nm) comparativamente ao tratamento com a sulfadiazina de prata 1% e a associação de ambas as terapias.

Optou-se por utilizar o rato Wistar como modelo animal porque são animais já utilizados em estudos semelhantes na literatura (CORAZZA et al., 2007; ASHEGANI et al., 2008; MEIRELLES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009).

Mello, Sampedro e Piccinini (2007) avaliaram os efeitos do laser HeNe (632,8 nm) a 4 J/cm² em queimaduras por lesão térmica. A terapia mostrou-se eficaz por acelerar o processo cicatricial, sendo a aplicação no modo varredura a mais benéfica, uma vez que levou à recuperação tecidual em menor tempo em relação aos grupos, pontual e controle.

Al-Watban e Delgado (2005) observaram que em ratos jovens a aceleração da cura foi mais elevada na faixa inferior de doses (1 a 5 J/cm²), confirmando a teoria de Enwemeka et al. (2004).

Al-Watban e Andres (2003) descreveram um experimento no qual foi avaliada a ação de LEDs policromáticos para promover a cicatrização de

queimaduras em ratos diabéticos e não diabéticos e constataram que os diferentes parâmetros utilizados provocaram efeitos distintos sobre os resultados do tratamento. Concluíram que o efeito do LED policromático (doses de 5 e 10 J/cm²) em não-diabéticos foi insignificante e que significativa estimulação foi observada nos ratos diabéticos (doses de 5, 10, 20, e 30 J/cm²), demonstrando que a terapia policromática LED afeta a cicatrização de queimadura em uma forma dose-dependente.

Em um estudo posterior, Enwemeka et al. (2004) também elucidaram que diferentes parâmetros podem influenciar os resultados desta modalidade de tratamento, afirmando ainda que existe um consenso emergente de que a cura pode ser acelerada se realizada com doses variando de 1 a 6 J/cm². Nesse sentido, o presente estudo, utilizando dose de 4 J/cm² corroborou com estes e outros estudos que, empregando luz coerente (NASCIMENTO et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; MELLO; SAMPEDRO; PICCININI, 2007; REIS et al., 2008) e não coerente na cicatrização de feridas (WHELAN et al., 2003; ERDLE et al., 2008) utilizaram doses semelhantes.

6.1 Ensaios Clínicos

Estudos investigaram os efeitos das fontes de luz coerente e não coerente a 670 nm, comprimento de onda próximo ao utilizado no presente estudo (640 nm) (WHELAN et al., 2003; LANGE et al., 2003; GAIDA et al., 2004; AL-WATBAN; DELGADO, 2005; GÁL et al., 2006; ERDLE et al., 2008; REIS et al., 2008). Meirelles et al. (2008a) ao analisarem os efeitos da biomodulação laser (660 e 780 nm), dose de 20 J/cm² no reparo de queimaduras de 3º grau em ratos diabéticos concluíram que, a reparação em animais que receberam irradiação com o comprimento de onda 660 nm foi mais efetivo na remoção de tecido necrótico pelo fagócitos. Este estudo norteou o emprego do comprimento de onda investigado no presente estudo.

A escolha da queimadura como modelo de ferida deveu-se à grande necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos da bioestimulação com laser e com LED nesses eventos, tanto em ratos diabéticos quanto em ratos não diabéticos e em

humanos. Há poucos estudos sobre esse tema na literatura, e os resultados de alguns trabalhos consultados apontaram que a irradiação de queimaduras não produziu efeitos significativos na reparação tecidual (SCHLAGER et al., 1999; SCHLAGER et al., 2000; ERDLE et al., 2008). Resultados de outras pesquisas ilustraram que a efetividade do tratamento ocorreu mais significativamente nos estágios primários do processo de cicatrização, corroborando com os nossos achados (AL-WATBAN; DELGADO, 2005; MEIRELLES et al., 2008a; MEIRELLES et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2008).

Em estudo realizado *in vitro* com fibroblastos humanos (HALLMAN et al., 1988) irradiados com laser HeNe (632.8 nm), foi demonstrado que nas diferentes fases de maturação, não ocorreu nenhum resultado significativo da radiação com a luz coerente sobre a proliferação celular. Os achados de Schlager et al. (1999) sustentaram o trabalho de Hallman et al. quando observaram que, nem a análise macroscópica, nem a histológica dos ferimentos irradiados, mostrou aceleração estatisticamente significativa da cicatrização, quando comparadas com as feridas do grupo controle.

A opção pelo tratamento tópico com a sulfadiazina de prata a 1% se deu pelo fato do fármaco ser um antibacteriano amplamente utilizado em tratamentos de queimaduras nas unidades de queimados de vários hospitais do país. A droga é um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra infecções de germes gram-negativos e gram-positivos sendo recomendada em lesões de segundo e terceiro grau (FERREIRA et al., 2003, CANDIDO, 2006). Isto explica a não ocorrência de infecções em todos os animais tratados com sulfadiazina.

6.2 Evolução da Reparação Tecidual

Há diversos relatos na literatura sobre os efeitos benéficos da fotobiomodulação após terapia com laser (BYRNES et al 2004; AL-WATBAN; ZHANG, 2004; RABELO et al., 2006; GRBAVAC et al., 2006; CARVALHO et al 2006; ARAÚJO et al 2007; DALL-AGNOL et al., 2009; MEDEIROS et al., 2009) e com LED de baixa potência (AL-WATBAN; ANDRES, 2003; VINCK et al., 2003;

WHELAN et al., 2003; CORAZZA et al., 2007; ERDLE et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009; MINATEL et al., 2009) na cicatrização de feridas cutâneas. Vários estudos demonstraram que a luz visível altera a resposta inflamatória, estimula a proliferação de fibroblastos, aumenta a deposição e a organização do colágeno e promove a revascularização (NICOLAU et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; RABELO et al., 2006; MELLO; SAMPEDRO; PICCININI, 2007; MEIRELLES et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009; CASALECHI et al., 2008; DINIZ et al., 2009; MEDEIROS et al., 2009).

Apesar de a literatura apresentar um grande número de estudos que empregaram a terapia com laser no reparo de feridas incisionais (MENDEZ et al., 2004; BYRNES et al., 2004; MAIYA; KUMAR; RAO, 2005; HERASCU, 2005; NASCIMENTO et al., 2006; GÁL et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; RABELO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; REIS et al., 2008), o mesmo não se pode afirmar sobre a laserterapia e a terapia LED na reparação de queimaduras.

No presente estudo a terapia com LED (640 nm, 110 mW de potência, dose de 16 J/cm² por sessão) foi utilizada como alternativa para o tratamento de queimaduras de terceiro grau, cujas lesões afetaram profundamente a pele, promovendo alterações vasculares e perda de proteínas, favorecendo o aparecimento de edema pelo aumento da permeabilidade vascular, dificultando assim, a cicatrização. A energia LED empregada em nível celular promoveu uma aceleração da resposta inflamatória.

O processo de cicatrização é complexo e envolve três fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e modelação. A fase inflamatória é considerada um processo preparatório para a formação do novo tecido. Caracteriza-se pelo aumento do fluxo sanguíneo e migração de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos, monócitos e fibroblastos (CÂNDIDO, 2006; GARROS et al., 2006).

No presente estudo, aos 7 dias de cicatrização as células inflamatórias apresentaram-se significativamente diminuídas nos grupos tratados com LED sem contato ($p < 0,01$) e com LED sem contato + sulfa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os resultados alcançados pelo nosso estudo corroboram com alguns trabalhos que empregaram laserterapia (PUGLIESE et al., 2003; RABELO et al., 2006; BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010).

Rabelo et al. (2006) enfatizaram que a fototerapia estimula a redução do número de células inflamatórias no sítio da lesão na fase inicial do processo cicatricial. Pugliese et al., (2003) observaram que nos grupos submetidos à terapia a laser, houve maior redução do edema e infiltrado inflamatório. Busnardo e Biondo-Simões (2010) verificaram que nas feridas cutâneas tratadas com laser HeNe, houve diminuição do número de células inflamatórias mais precocemente do que nas não tratadas, nos três tempos avaliados ($p < 0,001$).

Yu, Naim, Lanzafame (1994) verificaram que a PBM atua como um recurso para aumentar a quantidade de fatores de crescimento e citocinas liberadas pelos monócitos, que desempenham um papel importante na fase inflamatória da cicatrização. Byrnes et al. (2004) evidenciaram o efeito antiinflamatório da luz coerente (laser He-Ne de 632,8 nm) e concluíram que a fotobiomodulação melhorou significativamente a reparação tecidual quando utilizada em uma dose de 4 J/cm². No presente trabalho este fato pode ser constatado igualmente, ao utilizar-se a luz não coerente com a mesma dose de irradiação. Para os pesquisadores, a fototerapia em doses elevadas (acima de 20 J/cm²) pode inibir a resposta inflamatória e prejudicar o processo cicatricial.

Al-Watban e Delgado (2005) investigaram o efeito do laser em diferentes doses e protocolos no tratamento de queimaduras e comprovaram que em ratos mais jovens foi observada reparação mais rápida em doses menores (1 e 3 J/cm²).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os grupos tratados apresentaram menor concentração de células inflamatórias no sítio de lesão aos 7 dias de reparação, principalmente nos grupos LED em relação ao grupo controle.

A presença de tecido de granulação foi moderada no grupo sulfadiazina e marcadamente intensa, com moderada quantidade de infiltrados inflamatórios nos demais grupos no 14^o dia pós-queimadura. Estes achados confirmaram os resultados de um estudo anterior (MEIRELLES et al., 2008b), no mesmo período de observação que avaliou protocolos para o tratamento de queimaduras em ratos.

A presença de crostas em todos os espécimes ainda foi observada em 7 dias. Para Oliveira et al. (2008) a presença de crostas é necessária, pois funcionam como uma barreira mecânica entre o meio externo e o tecido lesado, facilitando a

migração das células para o tecido de cicatrização propiciando, assim, melhores condições para reparação celular.

Angiogênese é um fator importante à reparação tecidual. Está presente desde o início do processo cicatricial, uma vez que os vasos sanguíneos são responsáveis pela reposição de oxigênio e nutrientes às células, permitindo um aumento da taxa metabólica e atividade mitótica (YU; NAIM; LANZAFAME, 1997).

Na avaliação do número de vasos sanguíneos observou-se neovascularização intensa em quase todos os espécimes, tanto aos 7 quanto aos 14 dias, o que sugeriu estímulo de neoformação vascular com os parâmetros empregados na terapia com LED. O número de vasos do grupo sulfa (2,4) no 14º dia pós-queimadura foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) em relação ao grupo LED sem contato (5,8). Para Al-Watban e Andres (2003) o retardo e o prolongamento das respostas inflamatórias levam, conseqüentemente, ao atraso da angiogênese e depósito de colágeno, além da diminuição de nutrientes e oxigênio para iniciar e sustentar o processo de reparação. Os achados do presente estudo diferem dos resultados evidenciados por Rabelo et al. (2006), que demonstraram uma diminuição do número de vasos durante a primeira semana de reparo tecidual nos animais tratados com laser.

Corazza et al. (2007) verificaram que o tratamento com fluência de 5 J/cm² estimula a angiogênese mais intensamente do que o tratamento com 20 J/cm², corroborando com a tese de Enwemeka et al. (2004). Neste experimento, laserterapia e terapia LED induziram o aumento do número e do diâmetro dos vasos sanguíneos e, contribuíram para aumentar o fluxo e fornecer uma melhor perfusão sanguínea, demonstrando que a coerência da luz não foi fator fundamental para a angiogênese.

O fibroblasto desempenha um papel decisivo na cicatrização da ferida. No terceiro e quarto dia, após a lesão, fibroblastos originários de células mesenquimais, proliferam e tornam-se predominantes ao redor do décimo dia. Agem na produção de colágeno, matriz da cicatrização responsável pela força e integridade dos tecidos.

Vários autores estudaram os efeitos da TLBP sobre a proliferação de fibroblastos, crescimento e migração celular, e produção de colágeno (ALEXANDRATOU et al., 2002; ABRAHAMSE, 2005; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; HOURELD; ABRAHAMSE, 2007; HOURELD; ABRAHAMSE, 2008).

No presente estudo, um número moderado de fibroblastos foi evidenciado nos grupos controle e LED pontual, moderado a intenso no grupo LED sem contato e intenso nos grupos sulfadiazina, LED + sulfa pontual e LED + sulfa sem contato.

Na análise estatística dos grupos sulfa ($14,2 \pm 5,7$) e LED sem contato + sulfa o número de fibroblastos aos 7 dias foi maior neste último ($21,2 \pm 3,8$). Os resultados nos permitiram afirmar que a luz não coerente mostrou efeitos estimulatórios quando associado à sulfa e que foi superior à sulfa sozinha ($p < 0,05$). Os demais tratamentos não diferiram entre si, portanto não tiveram diferenças estatisticamente significativas.

Nossos resultados refutaram os de Hallman et al. (1988) quando, em uma cultura de fibroblastos humanos, irradiados com luz coerente (laser He-Ne a 0,9 mW), durante um período de 5 dias não evidenciaram estimulação nem inibição em comparação com o grupo controle tratado da mesma forma. Os estudos de Vinck et al. (2003) contrariaram os de Hallman et al. quando a análise estatística revelou uma maior taxa de proliferação ($p < 0,001$) em todas as culturas irradiadas, em comparação com os controles, resultando em um aumento da proliferação fibroblástica in vitro, demonstrando efeitos estimulatórios.

Esses achados também foram contrariados por Desmet et al. (2006) ao pontuarem que, ao nível celular, a terapia LED pode modular a proliferação de fibroblastos, ligação e síntese de colágeno, promover a angiogênese, melhorar o metabolismo energético dentro da mitocôndria, exercendo os seus efeitos biológicos durante a fase proliferativa da cicatrização de feridas.

A deposição de colágeno apresentou variações de acordo com o período e com os grupos analisados, apresentando pequenas variações entre os animais de cada grupo, sendo marcadamente discreta na grande maioria dos animais aos 14 dias de observação. Os resultados deste estudo corroboraram com os achados de Meirelles et al. (2008a, 2008b) quando encontraram sob microscopia, um pequeno a moderado número de fibras colágenas imaturas e fragmentadas também no 14^o dia de tratamento.

Em um estudo sobre a influência da TLBP na biomodulação das fibras colágenas e elásticas, Pugliese et al. (2003) observaram que os animais tratados apresentaram uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas, embora sem significância estatística ($p > 0,05$). No tratamento com a fluência de 4 J/cm²

evidenciaram melhores resultados do que naquele em que foi utilizada a fluência de 8 J/cm², corroborando a tese de Enwemeka et al. (2004) que descreveram a existência de significativa estimulação quando utilizadas doses de 1 a 6 J/cm². Rabelo et al. (2006) elucidaram que a fototerapia estimula a deposição de fibras colágenas, na fase inicial do tratamento e também na fase tardia do processo cicatricial.

Reepitelização foi predominantemente discreta nos grupos LED sem contato e LED + sulfa sem contato, variou de discreta a moderada nos grupos controle e LED contato pontual e de moderada a intensa nos grupos sulfadiazina e LED + sulfa contato pontual. A partir desta evolução da reparação tecidual ficou evidente a superioridade dos tratamentos que envolveram a sulfa e a associação de ambas as terapias.

Alguns pesquisadores empregaram, na última década, a medida do diâmetro da lesão para quantificar a aproximação das bordas da ferida (LUCAS; GEMERT; HAAN, 2003; HOPKINS et al., 2004; MARCON; ANDRÉ, 2005; ERDLE et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009). Em relação à evolução macroscópica do reparo da ferida, observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos aos 7 dias, porém não foram reveladas diferenças aos 14 dias.

No presente estudo, o diâmetro da ferida foi significativamente reduzido aos 7 dias nos grupos submetidos a irradiação com LED contato + sulfa ($p < 0,001$) e LED sem contato + sulfa ($p < 0,01$) em comparação ao grupo LED sem contato, revelando que o LED, associado à sulfa, apresentou-se como um tratamento superior em relação à dimensão da lesão, quando comparado aos demais tratamentos. Constatou-se que a velocidade na redução da ferida foi superior em relação aos tratamentos em que se utilizou LED + sulfadiazina de prata aos 7 dias, posto que aos 14 dias as lesões tinham, estatisticamente, as mesmas dimensões.

Neste estudo, os benefícios da terapia com LED associada à sulfa foram evidentes, visto que, através da análise de variância (ANOVA) foram encontrados resultados predominantemente significativos para os grupos que utilizaram o LED e sulfadiazina de prata.

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) Os animais dos grupos submetidos à terapia com LED, associado à sulfadiazina de prata, expressaram evolução macroscópica do processo de cicatrização superior ao grupo não tratado.
- 2) As análises, histopatológica e histomorfométrica mostraram que o número de células inflamatórias nos grupos submetidos à irradiação com LED revelou-se estatisticamente menor que no grupo controle aos 7 e aos 14 dias de observação.
- 3) As análises, histopatológica e histomorfométrica mostraram que o número de vasos sanguíneos do grupo tratado com LED sem contato revelou-se estatisticamente superior ao grupo tratado com sulfadiazina de prata aos 14 dias.
- 4) As análises, histopatológica e histomorfométrica mostraram que a proliferação de fibroblastos foi maior no grupo LED sem contato + sulfa no 14^o dia de tratamento em relação ao grupo tratado com sulfadiazina.
- 5) A radiação LED pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas em um modelo animal.

A reprodutibilidade dos resultados acerca da bioestimulação de tecidos biológicos com lasers e LEDs ainda é um desafio. Tentativas de se encontrar um protocolo que atenda a essa modalidade de tratamento continuam sendo estudadas, principalmente em queimaduras, uma vez que há uma enorme escassez de publicações. Por esse motivo, sugere-se mais pesquisas sobre a fototerapia com LED no processo de cicatrização de queimaduras.

REFERÊNCIAS

AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia** - Teoria e Prática. Santa Maria - RS: Orium, 2005. p. 309-328.

ALEXANDRATOU, E. et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.1, p.547-552, 2002.

AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. Polychromatic LED Therapy in Burn Healing of Non-diabetic and Diabetic Rats. **J. Clin Laser Med Surg.** v. 21. n. 5. p. 249-258, 2003.

AL-WATBAN, F. A. H.; DELGADO, G. D. Burn healing with a diode laser: 670 nm at different doses as compared to a placebo group. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.3, p.245-250, 2005.

AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. The Comparison of Effects between Pulsed and CW Lasers on Wound Healing. **J. Clin Laser Med Surg.** v.22, n.1, p.15-18, 2004.

ANDRADE, Z. A. Tecido Conjuntivo, Reparo, Regeneração e Cicatrização. In: **Patologia** - Processos Gerais. 4.ed, cap.8, p.148. São Paulo: Atheneu, 2004.

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

ASHEGANI, M. M. V. et al. Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.1, p.1-5, 2008.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatología**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.5-28.

BAXTER, G. D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Cleyton**. 10.ed. São Paulo: Manole, 1998. cap.13, p.191-210.

_____. **Therapeutic Laser**. USA: Ed. Churchill Livingstone; 1997. p.1-19.

BISPO, L. B. Light emitting diodes: the wave length and its importance. **Rev Dent on line** – ano 7, n.16, julho/dezembro, 2007. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/dentisticaonline>>. Acesso em: 01 jun.2009.

BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: <URL:<http://www.bapbaptista.com>>. Acesso em: 11 nov.2009.

BOGLIOLO FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.367 p.

BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica: agressão, defesa, adaptação, doença**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978.713 p.

BORGGUINON FILHO, A. de M. et al. Utilização do Laser de Baixa Intensidade no Processo de Cicatrização Tecidual. Revisão de Literatura. **Rev Port Estomat Med Dent Cirur Maxilof**. v.46. n.1. p.37-43, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas -**Cadernos de Reabilitação em Hanseníase**, n.2, p.11-29, 2002.

_____. Ministério da Saúde. **Saúde cria redes estaduais de assistência a queimados**. 22/11/2000. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticiasdetalhe.cfm?coseqnoticia=266>> Acesso em:01 jul 2009.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev Bras. de Fisiot**. v.14, n.1, jan/fev. 2010.

BYRNES, K. R. et al. Photobiomodulation Improves Cutaneous Wound Healing in an Animal Model of Type II Diabetes. **Photomed Laser Surg**. v. 22, n.4. p.281-290, 2004.

CAMPOS JÚNIOR, P. C. T. et al. Estudo comparativo da atividade antiinflamatória da laserterapia e do meloxicam. **Fisiot Bras**. v.8, n.2, p.132-135, 2007.

CÂNDIDO, L. C. **Livro do Feridólogo - Tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas**. São Paulo: Santos, 2006.

CARVALHO, P. de T. C. de et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirur Bras**. v.21, n.3, p.177-183, 2006.

_____. Collagen fibrea analysis through computerized morphometry in cutaneous wounds of rats submitted to HeNe laser radiation. **Fisiot Bras**. v.4, n.4, p.253-258, jul-ago, 2003.

CARVALHO, P. de T. C. de et al. The effects of low level laser therapy on cutaneous wounds in rats with experimental diabetes mellitus. **Fisiot Bras.** v.2, n.4, p.241-246, jul/ago. 2001.

CASALECHI, H. L. et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med Sci.**v.24, n.4, p. 659-665, 2009.

CORAZZA, A. V. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg.** v.25, n.2, p.102-106, 2007.

DALL-AGNOL, M. A. et al. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med Sci.**, v.24, n.4, p.909-916, 2009.

DESMET, K. D. et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomed Laser Surg.** v.24, n.2, p.121-128, 2006.

DINIZ, J. S. et al. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. **Lasers Med Sci.** v.24, p.347-52, 2009.

EISENBUD, D. et al. Hydrogel wound dressings: where we stand in 2003? **Ostomy Wound Manage.** v.49, n.10, p.52-57, 2003.

ELWAKIL, T. F. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. **Lasers Med Sci.** v.22, p.53-59, 2007.

ENWEMEKA, C. S. et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg.** v.22, p.323-329, 2004.

ERDLE, B. J. et al. Effects of continuous-wave (670-nm) red light on wound healing. **Dermatol Surg.** v.34, p.320-325, 2008.

FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Rev Esc Enferm - USP.** v.37, n.1, p.44-51, 2003.

FRARE, J. C.; NICOLAU, R. A. Clinical analysis of the effect of laser photobiomodulation (GaAs – 904 nm) on temporomandibular joint dysfunction. **Rev Bras Fisiot.** v.12, n.1, p.37-42, jan/fev. 2008.

GAIDA, K. et al. Low level laser therapy – a conservative approach to the burn scar? **Burns.** v.30, n.12, p.362-67, 2004.

GÁL, P. et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers Med Sci.** v.24, n.4, p.539–547, 2009.

_____. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. **Photomed Laser Surg.** v.24, n.4, p.480-488, 2006.

GARROS, I. de C. et al. Extrato de *Passiflora Edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirur Bras.** v.21, sup.3, p.55-65, 2006.

GENOVESE, W. J. **Laser de Baixa Intensidade** – Aplicações Terapêuticas em Odontologia. São Paulo: Santos, 2007. p.1-45.

GOMES, R. D.; SERRA, M. C.; MACIEIRA JR., L. **Condutas Atuais em Queimaduras.** Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.19-36.

GONÇALVES, R. V. et al. Influence of the gallium arsenide laser end gallium aluminum arsenide laser and a healing ointment on blood leukocytes in Wistar rats after cutaneous lesion. **Fisiot Bras.** v.10, n.3. mai/ jun, 2009.

GONÇALVES, W. L. S. et al. Influence of he-ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. **Braz J. Med Biolog Res.** v.40, p.877-884, 2007.

GRBAVAC, R. A. O. et al. Effects of laser therapy in CO2 laser wounds in rats. **Photomed Laser Surg.** v.24, n.3, p.389–396, 2006.

GUIRRO, E. C. de O.; GUIRRO, R. R. de J. **Fisioterapia Dermato-Funcional – Fundamentos – Recursos – Patologias.** 3.ed. Barueri – SP: Manole, 2004. p.4-32.

GUNGORMUS, M.; AKYOL, U. K. Effect of Biostimulation on Wound Healing in Diabetic Rats. **Photomed Laser Surg.** v.27, n.4, p.607-610, 2009.

HALLMAN, H. O. et al. Does low-energy Helium-Neon irradiation after in vitro replication of human fibroblasts? **Lasers Surg. Med.** v.8, n.2, p.125-129, 1988.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological Effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.3, p. 251-259, 2005.

_____. Phototherapy - a treatment modality for wound healing and pain relief. **Afr J. Biomed Res.** v.10, p.99-109, 2007.

HERASCU, N. et al. Low-level laser therapy (LLLT) efficacy in post-operative wounds. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.1, p.70-73, 2005.

HOPKINS, J. T. et al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **J Athl Train.** v.39, n.3, p.223-229, jul/set, 2004.

HOURELD, N., ABRAHAMSE, H. In Vitro Exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 j/cm². **Photomed Laser Surg.** v.25, n.2, p.78-84, 2007.

_____. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci.** v.23, n.1, p.11-18, 2008.

JORGE, S. A.; DANTAS, R. S. P. E. **Abordagem multidisciplinar no tratamento de feridas.** São Paulo: Atheneu, 2005.

KARU, T. I. Cellular mechanisms of low-power laser therapy. **Advanced Energy Medicine.** 2002. Disponível em: <http://www.tinnitus.us/tiinakarupresentation.html>. Acesso em: 26 jun. 2008.

_____. Low-Power Laser Therapy. In .VO-DINH , Tuan. **Biomedical Photonics Handbook.** CRC Press, 2003. cap.48. p.1-7, 2003.

_____. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **J. Quant Eletron.** QE-23. v.10, p.1703-1717, 1987.

LANG-BICUDO, L. et al. LED phototherapy to prevent mucositis: a case report. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.6, p.609-613, 2008.

LANGE, F. et al. Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau. **Fisiot Bras.** v.4, n.5, p.335-340, set/out, 2003.

LEAL JÚNIOR, E. C. P. et al. Effect of cluster Multi-Diode Light Emitting Diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. **Lasers Surg Med.** v.41, p.572-577, 2009.

LEITE, S. N. et al. Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras dorsais em ratos nutridos e desnutridos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA. 21., 16-20 de novembro 2008, Salvador, Ba. **Anais...** São Paulo: SBEB, 2008. p.1090-1093.

LUCAS, C.; GEMERT, M. J. C. V.; HAAN, R. J. de. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomised clinical trial. **Lasers Med Sci.** v.18, n.2, p.72-77, 2003.

MAIYA, G. A.; KUMAR, P. ; RAO, L. Effect of Low Intensity Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Diabetic Wound Healing Dynamics. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.2, p.187-190, 2005.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v.75, n.4, p.469-486, 2003.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An Bras Dermatol.** v.78, n.4, p.393-410, jul/ago, 2003a.

_____. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An Bras Dermatol.** v.78, n.5, p.525-542, set/out, 2003b.

MARCON, K.; SANFELICE, A. E. Efeitos do laser GaAlInp no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. **Rev Fisiot FURB.** v.1, n.1, p.1-8, 2005.

MARTINEZ, L. et al. Integra Artificial dermis in pediatric reconstructive surgery. **Cir Pediatr.** v.15, n.3, p.97-100, 2002.

MARTINS, C. B. de G.; ANDRADE, S. M. de. Queimaduras em crianças e adolescentes: análise da morbidade hospitalar e mortalidade. **Acta Paul Enferm.** v.20, n.4, p.464-469, 2007.

MEDEIROS, J. L. et al. Healing of surgical wounds made with lambda 970-nm diode laser associated or not with laser phototherapy (lambda 655 nm) or polarized light (lambda 400-2000 nm). **Photomed Laser Surg.** v.28, n.4, p.489-496, 2010.

MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN Healthlink, 2000. **Light Emitting Diodes Aid in Wound Healing.** Disponível em: <<http://healthlink.mcw.edu/article/975450257.html>> Acesso em: 13 jun. 2008.

_____. Effectiveness of laser photobiomodulation as 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.1, p.47-54, 2008a.

MEIRELLES, G. C. S. et al. A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree burns-a histological study in rats. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.2, p.159-166, 2008b.

MELLO, P. B.; SAMPEDRO, R. M. F.; PICCININI, A. M. Effects of the HeNe laser and of the application mode on healing burns in rats. **Fisiot Pesq.** v.4, n.2, p.6-13, 2007.

MENDES JÚNIOR, E. C. da S.; VITERBO, F.; ROSA, C. S. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. **Rev Assoc Med Bras.** v.53, n.5, p.395-400.2007.

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

MINATEL, D. G. et al. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med.** v.41, n.6, p.433-441, 2009.

NASCIMENTO, D. G. do et al. da. Efeitos da irradiação com o laser HeNe 632.8nm sobre a cicatrização de feridas em ratos. **Cien Cuid Saud.** v.5, n.2, p.229-235, mai/ago. 2006.

NICOLAU, R.A. et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci.** v.18, n.2, p.89-94, 2003.

OLIVEIRA, P. C. et al. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.4, p.289-299, 2008.

PENG, Q. et al. Lasers in medicine. **Rep Prog Phys.** v.71, 2008.

PUGLIESE, L. S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras.** v.17, n.4, p.307-313, 2003.

QUEIROZ, L.S. et al. Effect of LED irradiation on microcirculation of auricular mouse. **Rev Ass Paul Cir Dent.** v.62, p.138-42, 2008. BIREME/OPAS/OMS id: 539256.

RABELO, S. B. et al. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.** v.24, n.4, p.474-479, 2006.

REIS, S. R. A. et al. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.4, p.307-313, 2008.

RIBEIRO, M. S. et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **J. Clin Laser Med Surg.** v.22, n.1, p.59-66, 2004.

ROCHA JÚNIOR, A. M. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of *in vitro* and *in vivo* experimental studies. **J Vasc Bras.** v.6, n.3, p.258-266, 2007.

_____. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An Bras Dermatol.** v.81, n.2, p.150-156, 2006.

ROCHA, J. C. T. Terapia Laser, Cicatrização Tecidual e Angiogênese. **RBPS.** v.17, n.1, p.44-48, 2004.

SACONO, N. T. et al. Light-Emitting Diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. **Lasers Surg Med.** v.40, p.625-633, 2008.

SANTOS, V. L. C. G. **Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio.** Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu, 2000.

SCHLAGER, A. et al. Healing of burns treatment with 670-nanometer low power laser light. **Plastic Reconst Surg.** v.105, n.5, p.1635-1639, 1999.

_____. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. **Lasers Surg Med.** v.27,n.1, p.39-42, 2000.

SILVA, E. C. da; FILHO, A. H.; MUSSKOPF, D. E. Radiação Laser. In: **Manual de Recursos Fisioterapêuticos.** Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p.17-35.

SMITH, K. C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. Letter to the editor. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.1, p.78-80, 2005.

SOMMER, A. P. Antiinfectives and low-level light: a new chapter in photomedicine. **Photomed Laser Surg.** v.25, n.3, p.150-158, 2007.

THOMPSON, A.; SKINNER, A.; PIERCY, J. **Fisioterapia de Tidy.** Trad. Terezinha Oppido.12.ed. São Paulo: Santos, 2002. p.289-290.

VALE, E. C. S. do. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **An Bras Dermatol.** v.80, n.1, p.9-19, 2005.

VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci.** v.18, n.2, p.95-99, 2003.

WHELAN, H. T. et al. Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice. **J. Clin Laser Med Surg.** v.21, n.2, p.67-74, 2003.

_____. The NASA light-emitting diode medical program — progress in space flight terrestrial applications. **Space Technology and Applications International Forum**, DOI: [10.1063/1.1302454](https://doi.org/10.1063/1.1302454).

YU, W., NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. Effects of photo-stimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg. Med.** v.20, n.1, p.56-63, 1997.

_____. The effects of photoirradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **Photochem Photobiol.** v.59, p.167-170, 1994.