



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**NAUDIMAR DI PIETRO SIMÕES**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LASER He-Ne E A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
TECNOLOGIA EM SAÚDE  
PUCPR**

**PUCPR**

**CURITIBA  
2007**



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da Saúde**

**Naudimar Di Pietro Simões**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LASER He-Ne E A ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS**

Curitiba  
2007



NAUDIMAR DI PIETRO SIMÕES

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LASER He-Ne E A ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Tecnologia em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima da Costa Almeida

CURITIBA  
2007

Simões, Naudimar Di Pietro  
S593e      Estudo comparativo entre laser He-Ne e a estimulação elétrica no processo  
2007      de cicatrização de pele de ratos / Naudimar Di Pietro Simões ; orientador,  
Percy Nohama ; co-orientadora, Maria de Fátima da Costa Almeida. – 2007.  
103 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2007.

Bibliografia: f. 81-90

1. Tecidos (Anatomia e fisiologia). 2. Laser. 3. Pele – Efeito da eletricidade.  
4. Cicatrização de feridas. 5. Pele – Inflamação. I. Nohama, Percy. II. Almeida,  
Maria de Fátima da Costa. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed.612.028

## RESUMO

A reparação tecidual consiste em uma das características mais importantes dos seres vivos. Alguns fatores podem reduzir, retardar ou impedir este processo. Recursos como o LASER e a estimulação elétrica são indicados na aceleração do processo de cicatrização. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da terapia com LASER de baixa potência e da estimulação elétrica sobre o processo da cicatrização de feridas na pele de ratos. Utilizaram-se 45 ratos machos *Wistar*, submetidos a uma lesão no dorso, divididos em três grupos e tratados diariamente com: LASER He-Ne, dose de 4J/cm<sup>2</sup> (grupo LA); estimulação elétrica com intensidade 100μA, (grupo C.E) e injeção de diclofenaco de sódio, 3mg/Kg (grupo-controle D.C.F). As aferições foram realizadas no 1º, 2º, 5º, 7º e 15º dia de pós-operatório, ressecando-se retalhos da cicatriz. A preparação histológica das lâminas com Hemotoxilina-eosina (HE) e *Sirius red* forneceram uma análise de números de células do tecido de granulação, vasos neoformados e densidade de colágeno. Comparando-se os três tratamentos, ao longo do período, a análise das células do tecido de granulação, apresentou um aumento significativo no grupo (LA) no 7º dia do experimento ( $p=0,0379$ ) em relação ao controle. Os grupo C.E e D.C.F não apresentaram variação significativa (0,2105) comparados ao controle. Os vasos neoformados, apresentaram uma diferença significativo no grupo LA ( $p=0,0023$ ) e no grupo C.E ( $p=0,0325$ ) no 7º dia, em relação ao controle. A densidade de colágeno tipo III aumentou progressivamente entre o 3º e 15º dias nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica em relação ao grupo controle. Os resultados mostraram que a estimulação elétrica e o LASER são igualmente eficientes na aceleração da reparação tecidual. Observou-se um pico na proliferação de vasos no 7º dia, com conseqüente aumento progressivo de produção de colágeno tipo III, quando comparados ao controle (D.C.F).

Palavras-chave: LASER, Estimulação elétrica, Inflamação, Cicatrização.

## ABSTRACT

The tissue repairing consists of one of the most important characteristics of the living beings. Some factors can reduce, delay or hinder this process. Resources as LASER and electrical stimulation are indicated in the acceleration of the tissue repairing. The goal of this study was the comparison of the effect of low-power LASER to that obtained with electrical stimulation on the healing process of wounds in the skin of rats. Forty five male Wistar rats had been submitted to an injury in the back, divided in three groups and daily treated with: He-Ne LASER, dose of 4J/cm<sup>2</sup> for 30s (group LA); electrical stimulation with magnitude of 100µA (group C.E) and injection of sodium diclofenaco, 3 mg/kg (D.C.F control group). The gaugings had been carried through in 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> day after the surgery procedure of postoperative, drying up remnants of the scar. The histology preparation of the blades with Hemotoxilina-eosine (HE) and Sirius red had supplied cells of granulation tissue analysis of frame numbers of the granular, newborn vases and density of collagen. Comparing the three treatments, the analysis of cells of granulation tissue, throughout the period, had presented a significant increase in the group (LA) in 7<sup>th</sup> day of the experiment (p=0,0379). Groups C.E and D.C.F had not presented a significant (0,2105) variation. In relation to the newborn vases it had significant increase in the group (LA) in 7<sup>th</sup> day (p=0,0023), group C.E also presented in 7<sup>th</sup> day (p=0,0325), in relation to the control group (D.C.F). The density of collagen type III increased gradually between the 3<sup>rd</sup> and the 15<sup>th</sup> day in the groups treated with LASER and electrical stimulation in relation to the control group (D.C.F). The results indicate that the electrical stimulation and LASER are equally efficient in the acceleration of the tissue repairing. It was observed a peak activity at the 7<sup>th</sup> day for vessel's branching and consequently progressive increase of the proliferation of collagen type III when compared to control (DCF).

Key- words: He-Ne LASER, Electrical stimulation, Inflammatory process, Healing Process.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESQUEMA ILUSTRATIVO REPRESENTADO AS 3 FASES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	18
FIGURA 2 – LEI DE ARNDT - SCHULTZ COM A FASE PRÉ - LIMIAR (A); BIOESTIMULAÇÃO(B); BIOINIBIÇÃO (C).....	37
FIGURA 3 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS PRINCIPAIS CROMÓFOROS DA PELE .....	39
FIGURA 4 – POSSÍVEIS REAÇÕES PRIMÁRIAS COM CROMÓFOROS NA CADEIA RESPIRATÓRIA CELULAR.....	42
FIGURA 5 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS COM OS GRUPOS ANALISADOS .....	51
FIGURA 6 – MORFOLOGIA DO ESTIMULO ELÉTRICO UTILIZADO NA PESQUISA EXPERIMENTAL .....	52
FIGURA 7 – CÉLULAS DO TECIDO DE GRANULAÇÃO (MUITAS) NO 7º DIA – LASER .....	59
FIGURA 8 – CÉLULAS DO TECIDO DE GRANULAÇÃO (MUITAS) NO 7º DIA – DICLOFENACO DE SÓDIO .....	59
FIGURA 9 – FORMAÇÃO DE VASOS NO 7º DIA – LASER.....	61
FIGURA 10 – FORMAÇÃO DE VASOS NO 7º DIA – CORRENTE ELÉTRICA...	61
FIGURA 11 – MORFOMETRIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO III NO GRUPO CE NO 15º DIA - CONCENTRAÇÃO DE TONALIDADES VERDE/AMARELADA.....	64
FIGURA 12 – MORFOMETRIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO III NO GRUPO LA NO 15º DIA – CONCENTRAÇÃO DE TONALIDADES VERDE/AMARELADA.....	64
FIGURA 13 – MORFOLOGIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO III NO GRUPO DCF NO 15º DIA - CONCENTRAÇÃO DE TONALIDADE AVERMELHADA .....	65
FIGURA 14 – MORFOMETRIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO I NO GRUPO CE NO 15º DIA – TONALIDADE AVERMELHADA .....	65

FIGURA 15 – MORFOMETRIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO I NO GRUPO LA NO 15º DIA – TONALIDADE AVERMELHADA ..... 66

FIGURA 16 – MORFOMETRIA POLARIZADA DEMONSTRANDO FIBRAS COLÁGENAS TIPO I NO GRUPO DCF NO 15º DIA – TONALIDADE AVERMELHADA ..... 66

FIGURA 17 – MORFOLOGIA DO ESTIMULO ELÉTRICO UTILIZADO NA PESQUISA EXPERIMENTAL.....103

FIGURA 18 - CIRCUITO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE DESEMPENHO DO ESTIMULADOR ELÉTRICO .....103

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS LASER (LA), DICLOFENACO DE SÓDIO (DCF) E CORRENTE ELÉTRICA (CE) RELACIONANDO A OCORRÊNCIA DE “MUITAS CÉLULAS” DA GRANULOSA, POR GRUPO DE TRATAMENTO EM CADA DIA DO EXPERIMENTO ..... 57
- GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS LASER (LA), DICLOFENACO DE SÓDIO (DCF) E CORRENTE ELÉTRICA (CE) RELACIONADO A OCORRÊNCIA DE “MUITOS” VASOS NEOFORMADOS EM CADA DIA DE TRATAMENTO ..... 60
- GRÁFICO 3 – COMPARAÇÃO DO PERCENTUAL DE “MUITOS” VASOS ENTRE OS TRATAMENTOS LASER (LA), DICLOFENACO DE SÓDIO (DCF) E CORRENTE ELÉTRICA (CE) NO 7º DIA ..... 62
- GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DA QUANTIDADE DE COLÁGENO TIPO III NO 3º, 4º E 15º DIA EM CADA UM DOS GRUPOS DE TRATAMENTO (MEDIANAS) ..... 63
- GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DA QUANTIDADE DE COLÁGENO TIPO I NO 3º, 7º E 15º DIA EM CADA UM DOS GRUPOS DE TRATAMENTO (MEDIANAS) ..... 63

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – EFEITO DA CORRENTE ELÉTRICA NA INCORPORAÇÃO DE GLICINAS MAS PROTEÍNAS E NO ÁCIDO DE ALPHA-AMINOISOBUTÍRICO PELA PELE DURANTE A INCUBAÇÃO EM UM MEIO QUE CONTÉM O AMINOÁCIDO .....	24
QUADRO 2 – OS EFEITOS DA ELETROESTIMULAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DO ATP NA PELE DO RATO .....	25
QUADRO 3 – TIPOS DE EMISSÃO, COMPRIMENTO DE ONDA, PULSO E INDICAÇÕES DO LASER .....	33

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FÍGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 VISÃO GERAL DO PROBLEMA .....	1
1.2 MOTIVAÇÃO .....	3
1.3 OBJETIVOS .....	4
1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....	4
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>7</b>
2.1 REPARO DA PELE .....	7
2.1.1 Fase Inflamatória .....	8
2.1.2 Fase Proliferativa .....	14
2.1.3 Fase de Remodelamento.....	17
2.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO REPARO TECIDUAL .....	19
2.3 LASER.....	30
2.3.1 Princípios Físicos .....	31
2.3.2 Características .....	32
2.3.3 Parâmetros de Irradiação LASER.....	33
2.3.4 Interação com Tecido Biológico .....	38
2.3.5 Aplicação de Laserterapia – Base Científica da Aplicação Clínica do LASER de Baixa Potência .....	41
<b>3 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 GRUPO EXPERIMENTAL.....	49
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	49
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	51
3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA .....	53
3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUANTITATIVA MORFOMÉTRICA.....	53
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54

<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 CÉLULAS DA GRANULOSA.....	57
4.2 VASOS NEOFORMADOS.....	58
4.3 DENSIDADE DE COLÁGENOS TIPO I E III .....	62
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
5.1 ASPECTOS GERAIS .....	67
5.2 DA METODOLOGIA.....	70
5.3 SOBRE OS RESULTADOS .....	73
5.4 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	77
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

#### **1.1 VISÃO GERAL DO PROBLEMA**

Qualquer interrupção na continuidade das camadas constituintes da pele representa uma ferida. A cicatrização da ferida consiste em uma coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. A cicatrização é, portanto, um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comporta de forma harmoniosa, a fim de garantir a restauração tissular (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001). O reparo completo do tecido resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que vão gerar a substituição das células destruídas por células novas.

O processo de cicatrização envolve três estágios: inicialmente, um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (CLARCK, 1988). De forma mais detalhada, ainda de acordo com Clarck (1985), pode-se considerar descrição, mais detalhada, cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração de ferida e remodelação.

O processo inflamatório destrói, dilui ou engloba o agente agressor, preparando o tecido para a reparação (PRANDI et al.,1988). Dentre os fenômenos envolvidos nessa reação, pode-se observar uma fase inicial com ênfase na vascularização com neoformação de vasos, migração de leucócitos, mitose dos fibroblastos, ação de mediadores químicos como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandina (BOULTON; MARSHALL, 1986). A fase proliferativa caracteriza-se pela proliferação e migração dos fibroblastos e o desenvolvimento de matriz colagenosa. A remodelação consiste na fase final do processo, em que a matriz vai

sendo enriquecida por fibras de colágeno, formando finalmente a cicatriz (CLARCK, 1985).

Fatores locais ou sistêmicos tais como a localização da lesão, presença de corpos estranhos, desnutrição, diabetes e alterações vasculares entre outros, podem influenciar negativamente qualquer uma das fases de cicatrização (SANTOS, 2002). Porém, segundo Contran, Kumar e Collins (2001), as falhas mais importantes do reparo são as que ocorrem nos estágios iniciais, levando à acentuação do edema, o que reduz a proliferação vascular e diminui os elementos celulares tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos. As alterações desses eventos são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno, além de contribuírem para aumentar os riscos de infecções.

Atualmente, existem recursos fisioterapêuticos que agem no processo de cicatrização, melhorando a nutrição tecidual das áreas acometidas e vizinhas às feridas. Dentre os recursos utilizados, destacam-se a crioterapia, a radiação ultravioleta, o ultra-som, a estimulação elétrica, o LASER de baixa intensidade e a oxigenação hiperbárica (BAUERMANN et al. 2001).

A laserterapia tem sido utilizada no tratamento de feridas cutâneas desde a década de 60. Acredita-se que o avanço em sua utilização e o seu êxito devem-se às particularidades das respostas que induz nos tecidos como: redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose celular, aumento na mitose dos fibroblastos (LUBART et al., 1992; VAN BRENGEL; BAR, 1992), aumento da síntese de colágeno e da epitelização (WATSON, 2003; LOOW ; REED, 2001; ORTIZ, et al., 2001), aumento na síntese de mediadores químicos (ENWEMEKA et al., 1990; YU et al., 1994) e angiogênese (CORAZZA, 2005).

Com relação à estimulação elétrica na cicatrização de pele há fortes evidências que confirmam a facilitação na migração de células (ALCAIDE, 1998; ALVAREZ et al. 1993), (FALCONE; SPADARO, 1986; SPADARO; CHASE; WEBSTER, 1986), intra-crescimento dos fibroblastos e o alinhamento das fibras de colágeno foram incrementados com a estimulação elétrica, além da desaceleração sobre o crescimento das bactérias (FALCONE; SPADARO, 1986; SPADARO, CHASE; WEBSTER, 1986; XIAOBING; WANG; SEENG, 2001). Dentro do campo de experimentação clínica, Assimacopoulos (1968) mostrou que a estimulação elétrica,

quando aplicada para tratamento de úlceras causadas pelo enfraquecimento venoso, acelera o processo de cicatrização. Estudo feito por Cheng et al. (1982) com pele de ratos demonstrou o efeito da estimulação elétrica no aumento da adenosina trifosfato, na síntese de proteína, bem como no transporte da membrana plasmática (CHENG; VAN HOFF; BOCKX, 1982).

## 1.2 MOTIVAÇÃO

Segundo dados apresentados no 15º *Encontro* da Sociedade Européia de Reparo de Pele (2006), 3% da população mundial com mais de 65 anos, sofre com problemas relacionados à deficiência no processo de reparo de pele (Lubbers, 2006).

Dados descritos por Chen (1999) relatam que nos EUA aproximadamente 2 milhões de pessoas sofrem de algum tipo de ferida crônica, com gastos que chegam a 2 bilhões de dólares anuais.

No Brasil, apesar da falta de registros numéricos sobre a incidência de úlceras, considera-se, um problema importante para a saúde pública, em função da elevada incidência e custos (PEREIRA, 2002).

A incidência de úlceras de perna é elevada, acometendo 1 a 3 % da população de vários países da América, África e Europa (Cuzzel; Krasner, 2003).

Segundo Rogenski e Santos (2005), 45% dos pacientes internados em hospitais brasileiros desenvolvem úlceras.

Cuzzel e Krasner (2003) salientam a existência no mercado de aproximadamente 2.500 itens indicados para o tratamento de feridas crônicas e agudas. Apesar das inúmeras opções para auxiliar no processo de cicatrização, estes recursos muitas vezes são ineficazes, além de alguns produtos apresentarem custos elevados, tornando o tratamento inviável.

A fisioterapia utiliza tecnologias de baixo custo, tais como LASER e estimulação elétrica de baixa intensidade, como recursos de tratamento na regeneração dos tecidos. Trabalhos publicados indicam a eficácia do LASER de He-Ne no processo de cicatrização de pele (PARIZOTTO, 1998; BAUERMANN et al., 2001; VINCENSI; CARVALHO, 2002; MENDEZ, 2002; WIETZILKOSKI et al., 2003;

SIMÕES, et al., 2006; BALDAN, 2006; SONNEWEND, 2006). Da mesma forma, a estimulação elétrica tem sido referendada por alguns autores com a mesma função (OWOEYE; SPEIHZOLZ, 1985; CHU, 1996; BAKER, 1997; BOGIE et al., 2000; KLOTH, 2005; GODBOUT; FRENETTE, 2006; SIMÕES, 2006). Porém os estudos que utilizaram a corrente elétrica no processo de reparo de pele, constataram um número limitado de ensaios com controle, falta de quantificação e comparação de dados, além destes serem controversos no que diz respeito à intensidade, forma de onda, tempo de aplicação e posicionamento dos eletrodos. Com relação aos estudos sobre LASER de baixa potência, a maioria dos autores demonstra maior velocidade no processo de cicatrização, apesar de alguns resultados contraditórios.

Diante desse cenário e da falta de estudos que comparem os resultados da estimulação elétrica e do LASER de baixa potência no processo de reparo tecidual, justifica-se a continuidade de pesquisas nesta área.

### **1.3 OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho consiste em comparar a efetividade das tecnologias do LASER HeNe e da estimulação elétrica de baixa intensidade, no processo da cicatrização de feridas na pele de ratos.

Os objetivos específicos englobam:

- (1) estruturar modelo metodológico experimental;
- (2) aplicar protocolo experimental utilizando LASER no processo de regeneração tecidual;
- (3) aplicar protocolo experimental de estimulação elétrica no processo de regeneração tecidual;
- (4) analisar a partir do material biológico coletado os elementos relacionados com o processo de regeneração tecidual;
- (5) comparar quantitativamente células da granulosa, vasos neoformados e fibras de colágeno dos grupos tratados com LASER, Estimulação elétrica e Diclofenaco de sódio a partir de material biológico coletado.

## **1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

O conteúdo dessa dissertação foi dividido em 6 capítulos. No capítulo 1, apresentam-se os aspectos introdutórios sobre a problemática do reparo de pele assim como da falta de estudos comparativos entre as técnicas de estimulação elétrica e a radiação LASER no tratamento de reparo tecidual.

No capítulo 2, visando embasar o trabalho, descreve-se uma revisão bibliográfica sobre o processo de reparo tecidual, enfocando os aspectos histológicos, bioquímicos e fisiológicos relacionados ao processo inflamação-reparo. Outro aspecto descrito no decorrer do texto abrange o mecanismo de ação da estimulação elétrica e da radiação LASER.

No capítulo 3, descreve-se a metodologia adotada para a realização do trabalho, com a descrição do modelo experimental e levantamento de dados.

No capítulo 4, expressam-se os resultados por meio de tabelas, gráficos e relações estatísticas.

No capítulo 5, são discutidos os resultados encontrados defrontando com a literatura.



## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Nesta seção serão abordados, inicialmente, os aspectos histológicos, bioquímicos e fisiológicos relacionados ao processo de inflamação e reparação tecidual, como resposta às mais diversas lesões ou irritações. Na seqüência, serão relacionados aspectos teóricos sobre a aplicação da estimulação elétrica e do LASER no reparo tecidual.

#### **2.1 REPARO DE PELE**

A cicatrização ou auto-reparação é um dos atributos mais importantes dos seres vivos, representa a possibilidade de formação de estruturas que desempenham as mesmas funções daquelas originais (NELSON, 2003).

A reparação tecidual é um assunto de interesse constante na área de saúde, visto que o homem deve ao reparo a sua capacidade para enfrentar as lesões e reconstruir os tecidos (CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2001).

As lesões, agressões ou agentes lesivos, são muito numerosos e didaticamente são divididos em endógenos (do próprio organismo) e exógenos (do meio ambiente) (BRASILEIRO, 2000).

Toda lesão desencadeia respostas adaptativas locais ou sistêmicas, uma série complexa de eventos que têm a finalidade, sempre que possível, de cura e reconstituição do tecido agredido (PRADI et al., 1988; CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2001; MANDELBAUM, SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Alguns fatores podem reduzir, retardar ou impedir este processo. Dentre eles, pode-se citar: infecções, presença de corpos estranhos na área lesionada, desnutrição, alterações circulatórias conseqüentes de lesões vasculares, baixa perfusão dos tecidos decorrentes da compressão do corpo sobre o leito, diabetes e envelhecimento fisiológico (BRASILEIRO, 2000).

O reparo tecidual consiste na sucessão ou sobreposição de fase inflamatória e reparativa consistindo, na prática, como um evento único (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001). Na tentativa de compreender melhor esta complexa cascata de eventos, os autores pesquisados utilizam variadas classificações e subdivisões do processo inflamação/reparo.

Para Pereira (2004), o processo inflamatório pode ser entendido como uma superposição e sucessão de fenômenos: irritativos, vasculares, exsudativos, alternativos, produtivos e reparatórios.

Segundo Balbino (2005), a dinâmica dos eventos de reparação se divide em três fases: fase inflamatória, fibroblástica e deposição da matriz extracelular e fase de remodelamento.

### **2.1.1 Fase Inflamatória**

A inflamação foi descrita por Cornelius Celsus no primeiro século, da Era Cristã como sendo uma reação composta por quatro sinais: rubor, calor, tumor e dor (CAMERON, 2003). Mais tarde, um quinto sinal clínico, a perda de função, foi acrescentada por Virchow (1821-1902) (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

A inflamação é um termo derivado do latim que significa queimar. A resposta inflamatória serve para destruir, diluir ou isolar os agentes lesivos e as células do tecido que foram destruídas pela lesão (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BRASILEIRO, 2000; CLARCK, 1988).

Segundo Pereira (2004), inflamação ou flogose é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor caracterizado morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício.

O processo inflamatório nos vertebrados é caracterizado como uma reação dos vasos sanguíneos (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001). Esta resposta hemodinâmica consiste em um fator fundamental para o processo de reparo tecidual.

O primeiro sinal após uma lesão é uma constrição dos vasos sangüíneos, que nas lesões mais leves pode durar em torno de 3 a 5 s (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; CAMERON, 2003; BRASILEIRO, 2000).

Por descarga adrenérgica, sinalizada por estímulos físicos (trauma) e químicos (fragmentos de células lesadas), uma seqüência de eventos é disparada e o sangue coagulado, diminui a hemorragia. A coagulação é precipitada pela agregação de plaquetas, prosseguindo com sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas e pela liberação de uma “cascata” de enzimas, que convertem protrombina em trombina, transformando o fibrinogênio em fibrina insolúvel (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005). Este infiltrado forma um meio temporário que serve para coaptar as bordas das feridas e também para atração e movimentação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, responsáveis pelo processo de reparo (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005; MANDELBAUM, S.; SANTIS; MANDELBAUM, M.H. S, 2003).

Um aspecto de interesse em estudos mais recentes sobre inflamação diz respeito à adesão inicial de plaquetas à superfície lesada. Segundo Balbino (2005), a adesão das plaquetas ocorre por proteínas presentes nas suas membranas. Tais glicoproteínas apresentam sítios de ligação para o fibrinogênio, a vitronectina, a fibronectina e a trombospondina. Outra condição responsável pela adesão das plaquetas é a conversão de trombospondina em TxA<sub>2</sub> um forte agonista na agregação plaquetária e um importante vasoconstritor.

A vasodilatação dá continuidade ao processo, sendo um acontecimento fundamental envolvendo, inicialmente, as arteríolas seguidas pela abertura de novos capilares e vênulas (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

O aumento da circulação sangüínea local é a marca registrada da inflamação (PRANDI et al. 1988; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

As alterações vasculares consistem de uma cascata de reações ativadas e controladas por uma infinidade de mediadores químicos. Estas substâncias são responsáveis por todos os aspectos da inflamação. Os estudos científicos, *in vitro* vêm descobrindo inúmeros mediadores envolvidos no processo inflamatório. A origem dessas substâncias são os tecidos lesionados, o processo de agregação plaquetária e o plasma. Tais mediadores atuam principalmente na micro- circulação,

provocando, dentre outras modificações, o aumento da permeabilidade vascular. Podem ser classificados em: mediadores de ação rápido-transitória e mediadores de ação prolongada (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001).

Os mediadores de ação rápido-transitória são liberados imediatamente após a lesão e têm ação principalmente sobre os vasos, envolvem o grupo das aminas vasoativas, atingem um máximo em 5 a 10 min e depois desaparecem entre 15 a 30 min (RANG, 2001).

As aminas vasoativas são originadas do tecido agredido e atuam sobre a parede vascular. Compreendem, dentre outros, a histamina e a serotonina. A histamina é sintetizada nos granulócitos, basófilos, plaquetas e, principalmente, nos mastócitos que liberam este mediador quando agredidos e, como consequência, ocorre uma contração das células endoteliais venulares, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BRASILEIRO, 2000; RANG, 2001).

A serotonina, encontrada nas plaquetas, tem uma ação semelhante, esta amina causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, mais especificamente, das vênulas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os mediadores de ação prolongada são liberados mais tardiamente e, diante da persistência do agente lesivo, atuam nos vasos principalmente, na quimiotaxia celular. São mantidos por diversas horas ou por dias, dependendo da gravidade da lesão. Dentro desta classificação, encontram-se as substâncias plasmáticas e os mediadores de natureza lipídica (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001).

As substâncias plasmáticas estão divididas em três grandes sistemas: o sistema das cininas (envolvendo, principalmente, a plasmina e a bradicinina), o sistema complemento e o sistema de coagulação (representado pelo fibrinopeptídeo) (CAMERON, 2003).

A plasmina é uma protease que digere uma ampla gama de proteínas teciduais, tais como a fibrina, protrombrina e globulina. Sua forma inativa, o plasminogênio é ativado por enzimas lipossômicas, quinases bacterianas, teciduais e plasmáticas. A presença da plasmina incrementa a permeabilidade vascular (CONTRAN; KUMAR e COLLINS, 2001).

A bradicinina é um peptídeo ativado no interstício, com ação vasodilatadora de pequenas artérias e arteríola, aumenta a permeabilidade vascular e por atuar em terminações nervosas pode provocar dor (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; BRASILEIRO, 2000). A bradicinina, além de propriedades vasoativas, induz à metabolização do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; RANG, 2001). Este ácido consiste em um composto graxo insaturado (RANG, 2001) e pode ser liberado por inúmeros estímulos, sendo a lesão celular uma fonte importante de liberação. Sua ação está relacionada a várias etapas do processo inflamatório, dentre elas destaca-se a atividade quimiotática (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

O sistema do complemento é um conjunto de proteínas que se ativam em cascata, cujas proteínas são nomeadas com números por ordem de descoberta (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>). Este sistema é normalmente ativado por complexo antígeno-anticorpo, servindo como mediador das lesões imunológicas e inflamatórias (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BRASILEIRO, 2000; RANG, 2001). Os componentes do complemento com atividade biológica na inflamação produzem, de maneira geral, as seguintes reações: aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

O sistema de coagulação-fibrinolítica é formado por um grupo de proteínas do plasma que, quando ativadas, transformam o fibrinogênio em fibrina por ação da trombina; esta, por sua vez, ativa as plaquetas e cria um meio para a ligação da vitamina K ao cálcio, formando, então, a coagulação inicial, já citada. O sistema fibrinolítico tem ação no aumento da permeabilidade vascular, além de ação quimiotática sobre os neutrófilos (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001).

Os mediadores de natureza lipídica são lipídios ácidos encontrados nas membranas e estão envolvidos no processo de formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (RANG, 2001). As prostaglandinas são consideradas uma família de compostos de ácidos graxos que, na sua maioria, têm origem a partir do ácido araquidônico. Participam das fases mais tardias da inflamação, sendo considerados potentes vasodilatadores, que aumentam a permeabilidade vascular. O edema inflamatório é fortemente influenciado pela ação potencializadora da

bradicinina sobre outro mediador químico: a histamina. E essa relação potencializadora ocorre também sobre a dor (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001). As prostaglandinas também estão envolvidas com o sinal inflamatório de calor, sendo consideradas um mediador importante na regulação térmica e aparecimento da febre em reações inflamatórias (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001).

Além da resposta hemodinâmica, os mecanismos celulares fazem parte integrante do processo inflamatório e, conseqüentemente, do reparo.

Os sinais inflamatórios são resultantes da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias, cuja ativação é desencadeada por estímulos físicos ou químicos a partir das células ou fragmentos de tecidos lesados ou mediadores inflamatórios pré-formados ou neo formados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

As células envolvidas na inflamação podem ser agrupadas em: células presentes nos tecidos (endoteliais vasculares, mastócitos, e macrófagos) e células que chegam a partir do sangue (plaquetas e leucócitos) (RANG, 2001). Os leucócitos são ativamente móveis e se dividem em: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (monócitos e linfócitos) (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001).

Os mastócitos são células que estão normalmente presentes nos tecidos lesados e secretam diversos mediadores químicos: um dos principais é a histamina, outros são a heparina, os leucotrienos, as prostaglandinas, fator de ativação de plaquetas, fator de crescimento neural e algumas interleucinas (RANG, 2001). A histamina liberada produz vasodilatação arteriolar, aumenta a permeabilidade vascular e possibilita a passagem das proteínas do plasma para o interstício, especialmente, o fibrinogênio (PEREIRA, 2004). Os neutrófilos são os primeiros tipos de leucócitos a alcançar a área inflamada, aderem às células endoteliais vasculares, atraídos por quimiotaxia; daí migra até os agentes agressores (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; RANG, 2001). Os neutrófilos participam da resposta inflamatória com função de eliminação de microorganismos pela fagocitose, são auxiliadas pelos macrófagos, células tradicionalmente reconhecidas como células fagocitárias; estas, além de eliminarem fragmentos teciduais e

microorganismos, removem neutrófilos que perderam sua função (NEWMAN; HENSON J.; HENSON P., 1992).

Dentre as inúmeras funções dos macrófagos no processo inflamatório, destaca-se a de liberação de enzimas, que teriam um papel de degradar o tecido conjuntivo, limpando a área lesada, e a liberação de inúmeros mediadores químicos (lipídios, peptídeos, fatores de coagulação e fatores de crescimento) (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os mediadores químicos produzidos pelos macrófagos são de fundamental importância para intensificar a migração e a ativação dos fibroblastos (principal célula envolvida na próxima etapa – proliferativa) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os eosinófilos parecem ter funções semelhantes às dos neutrófilos. Essas células aparecem nas últimas fases do reparo. Acredita-se que elas sirvam para degradar os mediadores químicos, função possível pela presença de uma enzima chamada histaminase, presente nos grânulos desta célula. Esta enzima tem função na eliminação da histamina (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

Os basófilos são células que têm funções semelhantes aos mastócitos, na sua estrutura contém grânulos que são preenchidos por heparina e histamina, cuja ação mais específica estaria ligada com as reações de hipersensibilidade (RANG, 2001). Para o interesse deste estudo, é suficiente o entendimento que em conjunto com os mastócitos, essas células liberam histamina e heparina, importantes mediadores do processo inflamatório, como já discutido anteriormente (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

Os monócitos possuem funções que se assemelham às desempenhadas pelos macrófagos. Estas células que são encontradas em grande quantidade nos estágios tardios da inflamação, com atividade de fagocitose e de digestão de invasores e de partículas estranhas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os linfonodos desempenham função secundária de defesa; são ativados a partir do sistema linfático quando a reação inflamatória local não consegue neutralizar a lesão.

As células endoteliais representam papel importante na resposta dos tecidos a mecanismos patogênicos de muitas lesões. O endotélio pode ser estimulado por

citocinas, quimiocinas, variações do fluxo sangüíneo, variações de O<sub>2</sub>, mediadores (histamina, prostaglandinas, leucotrienos). As principais contribuições dessas células relacionam-se com a produção de substâncias que ativam a coagulação, fatores de aderência dos leucócitos e vasomotricidade (PEREIRA, 2004).

As plaquetas são fundamentais na cicatrização. Quando ativadas, liberam grânulos que agem como poderosos fatores pró-coagulantes: fator plaquetário 4, serotonina, tromboxano A<sub>2</sub> e cálcio. Esses produtos contidos nos grânulos causam a agregação de outras plaquetas formando um agregado, constituindo o tampão plaquetário, fundamental na fase inicial da cicatrização (BRASILEIRO, 2004).

### **2.1.2 Fase Proliferativa**

Esta fase caracteriza-se pela migração e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e pequenos vasos na área lesada, formando o tecido de granulação. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação, produzem e organizam os principais componentes extracelulares. A migração e ativação do fibroblasto ocorrem por influência de mediadores químicos produzidos principalmente pelos macrófagos e plaquetas (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O número de fibroblastos ativados desencadeia a síntese de mucopolissacarídeos e de fibras de colágeno.

A proliferação dos fibroblastos, ou fenômeno de fibroplasia, depende da liberação de fatores de crescimento: (1) dos fibroblastos (FGF); (2) das plaquetas (PDGF), produzidas por macrófagos e (3) transformante beta (TGF), produzido por linfócitos e macrófagos. Os fibroblastos proliferam, deslocam-se e iniciam o depósito de ácido hialurônico e colágeno do tipo III, formando uma matriz extracelular fluida, permitindo a migração de células e a formação de um ambiente propício para a sobrevivência e diferenciação das mesmas, conhecido pelo nome de tecido de granulação (PEREIRA, 2004).

Algumas vezes, a formação do tecido de granulação inicia-se nas primeiras 24 h, através da proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais, no período de 3 ou 5 dias, ocorrendo a combinação de neovascularização, fibroblastos,

miofibroblastos e matriz extracelular, formada por colágeno e ácido hialurônico, dando origem a um tecido conjuntivo ricamente vascularizado que preenche a área lesada (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Na seqüência, o depósito de colágeno aumenta progressivamente até que, no 14.º dia após a lesão, atinge o seu pico. Em paralelo ocorre a redução de ácido hialurônico e o predomínio de colágeno tipo I (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

Os fibroblastos sintetizam procolágeno, composto por 3 cadeias de polipeptídios, formando tropocolágeno. Múltiplas cadeias de tropocolágeno, formam fibrinas de colágeno que formam filamentos de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O termo colágeno é genérico e pode significar diferentes tipos de formação em cadeia compostas basicamente por glicoproteínas. Existem cerca de 20 tipos de cadeias alfa, que são capazes de originar até 1000 tipos diferentes de colágeno, dos quais 11 tipos já foram identificados, sendo que os mais conhecidos são os tipos I, II e III. Nas feridas, os tipos e quantidades de colágeno são modificados dependendo do estágio do processo de reparo (KITCHEN, 2003; BRASILEIRO, 2000). O colágeno tipo III (embrionário) vai sendo gradualmente absorvido e substituído por colágeno tipo I, que é do tipo fibrilar maduro. O do tipo IV normalmente é produzido como parte da membrana basal quando a pele é lesada e o colágeno do tipo V é depositado em torno da célula como suporte estrutural (ROCHA, 2004).

Um processo de regeneração adequado parece estar relacionado com o equilíbrio entre a estimulação e a inibição do colágeno. O metabolismo do colágeno pode ser afetado por citocinas como a TGF- $\beta$ , IL-1 e TNF, sendo que a inibição destas substâncias é dado pelas citocinas do tipo IFN ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), TNF- $\alpha$ , e PGE<sub>2</sub> (KITCHEN, 2003). Os colágenos são as principais proteínas da matriz extracelular perfazendo aproximadamente 25%. Suas fibras são birrefringentes e, portanto, quando examinadas ao microscópio de polarização apresentam-se brilhantes contra um fundo escuro (GUIRRO, 2002).

Segundo Carvalho (2003), as falhas que ocorrem na fase inicial do reparo da pele são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno.

Outra substância produzida pelos fibroblastos é o ácido hialurônico, um polissacarídeo com característica hidrófila que auxilia na resistência do tecido de

granulação a compressão (RANG, 2001) parecem facilitar a mobilidade celular além de realimentar a produção de colágeno (LARK; LATERRA; CULP, 1985).

Observa-se uma realimentação entre o ácido hialurônico e a proliferação de fibroblasto, pois esse ácido é importante agente na proliferação deste tipo de célula. O ácido hialurônico permite a atração de cátions, principalmente, o sódio, estimulando a osmose de uma grande quantidade de água, formando um gel hidratado que favorece o trânsito de nutrientes, hormônios e outros mediadores químicos que também atuam na mobilidade e crescimento do fibroblasto. Toda essa situação favorece o início da deposição de colágeno para formar a matriz extracelular de uma ferida (PEREIRA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; KITCHEN; BAZIN, 2003).

Os fibroblastos também sintetizam fibronectina, agente químico que desempenha papel de facilitador da atração de fibroblastos e células endoteliais e o aumento da ligação de fibroblastos na fibrina.

Com o número aumentado de fibroblastos e conseqüente aumento de fibras de colágeno e de elastina, a matriz extracelular começa a ser substituída por tecido conjuntivo mais forte e elástico. Esta fibroplasia exige a formação de vasos sanguíneos para sua realimentação (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005).

Como já citado, a angiogênese é fundamental na fase proliferativa; então, um sistema vascular extensivo será necessário para suprir a fase proliferativa, existindo uma relação fundamental entre a quantidade de vasos na ferida, a quantidade suficiente de oxigênio e a formação de procolágeno (CARVALHO, 2002). Para a formação de novos vasos, serão necessários múltiplos estímulos, desencadeados no momento da lesão e nos estágios iniciais do reparo. Inicialmente, ocorre um brotamento de capilares, as células endoteliais migram em direção à lesão como um cordão de células, formando o lume dentro dos cordões e o fluxo sanguíneo é progressivamente estabelecido (CLARCK, 1985). As pontas desses novos vasos são muito permeáveis permitindo a infiltração de proteínas e glóbulos vermelhos para o espaço intersticial, o que explica a persistência do edema após a fase aguda (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

As células endoteliais desempenham um papel fundamental na angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento dos

fibroblastos (FGF), estão fortemente relacionados com a formação de novos vasos (PEREIRA, 2004). Segundo Bacit e Akin (2001), o VGEF é um dos fatores mais importantes na angiogênese. As citocinas angiogênicas também desempenham papel importante na neoformação de vasos, entre elas a TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8, e as antiangiogênicas, angiostatina e endostatina. Ocorre também anastomose e reorganização dos vasos pré-existentes, resultando em um vasto suprimento sanguíneo dentro do tecido de granulação.

Outro aspecto da fase proliferativa é a contração da ferida, importante para o fechamento da mesma. A contração inicia-se logo após a lesão e

tem o seu auge em 15 dias. Quando a contração é insuficiente e lenta, favorece ao sangramento e à infecção; porém, a contração intensa pode causar contraturas, retrações e possíveis disfunções (WATSON, 2003). São consideradas duas teorias para explicar este mecanismo. A teoria da contração celular sugere, um processo de contração da ferida, pela ação contrátil dos miofibroblastos (estruturas já discutidas). Essas células através de atividade sincronizada, desencadeiam retração da ferida e encolhimento da mesma (WATSON, 2003). A teoria da tração celular sugere uma ação dos fibroblastos, cujas células exerceriam força de tração nas fibras da matriz extracelular.

### **2.1.3 Fase de Remodelamento**

O processo de remodelamento é considerado, didaticamente, a terceira fase do processo de reparo, apesar da matriz iniciar seu amadurecimento quase no mesmo tempo em que é formado. A matriz vai sendo gradualmente substituída e remodelada nos meses e anos subseqüentes. Nos estágios iniciais, o colágeno apresenta pouca força tensil e tem um aspecto semelhante ao de um gel. Com a evolução do processo, as fibras de colágeno do tipo III vão sendo substituídas por fibras do tipo I (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

O colágeno imaturo (tipo III) vai gradativamente passando de um aspecto de gel para uma estrutura com maior força tensil. Por volta do 21º dia, a ferida apresenta uma força tensil aproximadamente igual a 20% da força normal da pele (KITCHEN, 2003).

Todas as fases ou eventos descritos na figura 1 podem ser comprometidos por fatores classificados em: sistêmicos e locais.

Entre os fatores sistêmicos, podem-se destacar a idade, o estado nutricional, doenças associadas e o uso contínuo de medicamentos, em especial as drogas imunossupressoras. Dentre os fatores locais, a localização anatômica da ferida, infecção e desvitalização dos tecidos podem ser agravantes para o fechamento de uma ferida (SANTOS, 2000).

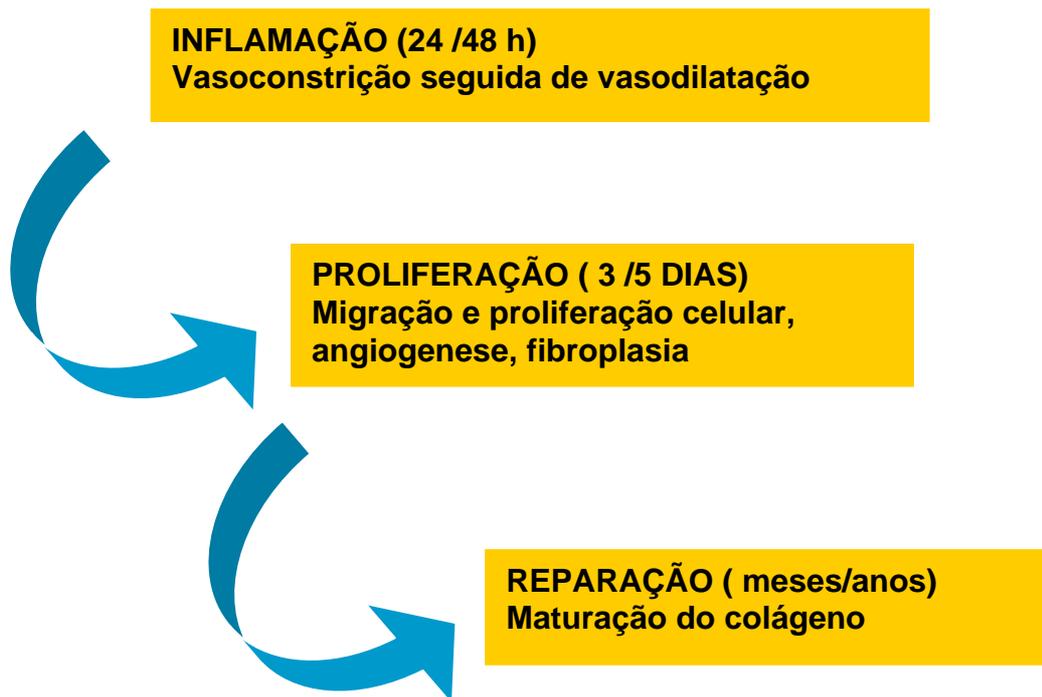


Figura 1 – Esquema ilustrativo representado as 3 fases do processo inflamatório com seus sinais característicos.

A idade gera impacto no funcionamento de todos os sistemas orgânicos, dificultando a cicatrização. O estado nutricional pode interferir, em função da importância das proteínas para a síntese de colágeno, proliferação epidérmica e neovascularização, sendo que a hipoproteinúria prolonga a cicatrização e colabora para a imunossupressão (TURNER, 1978).

As feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparação tissular em agudas e crônicas. Outra classificação complementar utilizada para feridas, refere-se às estruturas anatômicas comprometidas e a profundidade da

lesão (SANTOS 2000). As lesões podem ocorrer por incisão, abrasão, laceração, avulsão, perfuração, esmagamento ou queimadura (DEALEY, 1996).

Na tentativa de interferir terapêuticamente sobre o comprometimento, local ou sistêmico, do processo de reparo tecidual, várias investigações vêm sendo realizadas. Tratamento farmacológico e fitoterápico, exercícios fisioterapêuticos (BERNARD et al., 2002), terapias gênicas (ISHII et al., 2004).

Entre os recursos mais utilizados, nas últimas décadas, destaca-se a laserterapia (BAXTER, 1994). A estimulação elétrica vem sendo estudada desde o século XVII como recurso de tratamento de feridas (WATSON, 2003); porém a partir da década de 60 várias publicações foram popularizando esta forma de tratamento. Nos Estados Unidos, a partir de 2002, a estimulação elétrica passou a ser paga nos centros de saúde. Desde então, são tratados indivíduos portadores de úlceras de pressão, úlceras venosas, arteriais e diabéticas.

## **2.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO REPARO TECIDUAL**

As correntes elétricas vêm sendo utilizadas em reabilitação, no tratamento de diversas disfunções (KITCHEN; BAZIN, 2003; CAMERON, 2003).

O estudo e o entendimento de que a condução elétrica dos sistemas biológicos desencadeia efeitos fisiológicos e terapêuticos é tão antiga quanto a descoberta de que os sistemas biológicos são um meio condutor (NELSON, 2003).

O médico italiano, professor de obstetrícia e anatomia Luigi Galvani (1737-1798), foi um dos primeiros a investigar experimentalmente o fenômeno chamado “bioeletrogênese”. Este descobriu que a corrente elétrica causava a contração dos músculos na perna de sapos e de outros animais. Galvani observou também que a contração muscular ocorria quando os músculos eram colocados em contato com dois metais diferentes (zinco e cobre).

As cargas elétricas aplicadas em um corpo desencadeiam variados efeitos que são dependentes da amplitude e da natureza da corrente elétrica (LOOW; REED, 2001). Estes efeitos são possíveis em função das células exibirem inúmeras propriedades elétricas como, tensão, capacitância, fluxo de corrente e de resistência (KITCHEN, S.; BAZIN, 2003).

A eletrofisiologia ganhou notoriedade, com o professor de fisiologia Emil Heinrich Du Bois Reymond, responsável pelo desenvolvimento de um novo tipo de galvanômetro capaz de detectar o que ele chamou de “corrente de ação”, posteriormente chamado de “potencial de ação” (SABBATINI, 2005).

O interesse pela estimulação elétrica no processo de regeneração de pele tem registros que datam do século XVII, quando da utilização de folhas de ouro na cicatrização de feridas causadas por varíola (KITCHEN, S.; BAZIN, 2003).

Em 1860, Du Bois Reymond verificou que um dedo lesionado e sangrando era eletricamente positivo em comparação ao dedo não lesionado, resultando numa corrente elétrica na ferida de aproximadamente 1 $\mu$ A de amplitude (ROBINSON; MACKLER, 2000; ALCAIDE; ALMEIDA, 2001).

Por volta de 1869, Berstein postulou que as células possuem potencial de membrana; porém, a corrente elétrica desencadeada em um ferimento modifica-se por alterações elétricas nas membranas celulares (BECKER; MARINO, 1982). Em 1938, Harold Burr et al. verificaram, em animais de laboratório, uma mudança no potencial na lesão por toda a extensão de uma cicatriz (KITCHEN; BAZIN, 2003; CHAMBARELLI, 1992).

Dois anos mais tarde, em 1940, Harold Burr et al. estudaram o potencial elétrico de superfície em pacientes submetidos a uma cirurgia abdominal e verificaram que o potencial elétrico sobre as cicatrizes era no início positivo e após o quarto dia tornava-se negativo até a completa cicatrização (GUIRRO; GUIRRO, 2000).

Em 1945, Barnes mediu o potencial elétrico das feridas em humanos. Inicialmente, foi medido o potencial entre as pontas de dedos homólogos não lesados (direito e esquerdo) de 70 homens. Em seguida, uma lesão foi provocada até o sangramento das pontas dos dedos da mão esquerda (exceto o polegar). Imediatamente após a lesão e até o término do processo de cicatrização os potenciais eram medidos. Antes da lesão, os pontos medidos foram inferiores a 1mV, imediatamente após a lesão, variaram entre 15 e 50 mV, sendo os dedos lesionados mais positivos (KITCHEN; BAZIN, 2003). Na mesma linha, em 1967, Becker observou que a superfície de uma ferida cutânea é eletricamente positiva em

relação à pele circunjacente e esse potencial diminui com a progressão do processo de cicatrização (BECKER; MARINO, 1982).

Em 1960, Becker demonstrou que a corrente elétrica endógena é o gatilho que estimula o restabelecimento, crescimento e a regeneração de todos os tecidos orgânicos vivos (BECKER; SPADARO 1972; KIRSCH; LERNER, 2002; KIRSCH; LERNER, 2002; MERCOLA; KIRSCH, 1995).

Em 1985, Carley e Warnapel relataram que os tecidos vivos possuem eletropotenciais de corrente contínua que regulam, em parte, o processo de cicatrização dos tecidos. Mais tarde, em 1990, Weiss et al. e em 1991, Grifte, comprovaram tais relatos (KIRSCH; LERNER, 2002; KIRSCH, 2002; KITCHEN; BAZIN, 2003)

Becker e Spadaro (1972) foram responsáveis pelo desenvolvimento de um modelo teórico para tentar explicar a relação das correntes elétricas endógenas e o processo de cicatrização e reparação dos tecidos. Segundo os autores, uma lesão desencadeia no sistema vivo uma série de correntes elétricas complexas, que são responsáveis por um potencial bioelétrico alterado nos tecidos. Este efeito elétrico local (corrente de lesão) seria o responsável pela mitose celular. Esta teoria não descarta a importância dos mediadores químicos envolvidos na cicatrização e já citados no capítulo 1; entretanto, sugere que as correntes elétricas endógenas sejam responsáveis pela deflagração e direcionamento deste processo.

No decorrer do tempo, atraídos por essas várias idéias, pesquisadores que serão citados no decorrer deste estudo, desenvolveram propostas para a utilização de correntes elétricas exógenas, na tentativa de acelerar a cicatrização e o reparo tecidual. Apesar da eletroterapia ser uma forma de tratamento utilizada desde o século XVII, com o crescimento da tecnologia na área da bioengenharia, equipamentos e novos tipos de correntes elétricas estão sendo estudadas e aplicadas pela comunidade científica, e suas propriedades terapêuticas descritas em vários estudos nos últimos anos (ALCAIDE; ALMEIDA, 2001).

Em 1982, Becker e Marino, publicaram o livro “Eletromagnetism & Life”, no qual os autores relatam a origem da bioeletricidade, a função fisiológica da energia eletromagnética intrínseca e os efeitos da energia eletromagnética nos órgãos do corpo humano. Descrevem vários trabalhos seus e de outros cientistas que

aplicaram corrente elétrica de baixa intensidade, similares às que fluem no corpo humano e obtiveram o restabelecimento das feridas e a cicatrização óssea (BECKER; MARINO, 1982).

Para Thomas Wing (1989), apud ROBINSON e MACKLER o papel da eletricidade no controle dos tecidos vivos, recebeu um impulso muito grande com os trabalhos de Becker, considerado um nome importante no campo da “regeneração dos tecidos” (ROBINSON; MACKLER, 2000).

Lorner e Kersch, em 1981, desenvolveram um sistema chamado “terapia da biocondutividade”, com o objetivo de gerar corrente na faixa de microampères que aumentava a “corrente de dano”, controlando a dor e iniciando o restabelecimento da ferida (KIRSCH; LERNER, 2002).

Em 1993, Wendsos Lester e Henrring, apud MERCOLA e KIRSCH, 1995 verificaram que a área ferida tem uma resistência elétrica maior que a área do seu redor, diminuindo assim a condutância elétrica na região ferida e concluíram que a aplicação da estimulação elétrica de baixa intensidade no local ferido aumenta o fluxo endógeno e permite às células a recuperação da sua capacitância, reduzindo a resistência ao fluxo endógeno e facilitando o restabelecimento da homeostase local.

Existe um volume substancial de estudos *in vitro* e *in vivo*, relacionando os efeitos da estimulação elétrica na regeneração de tecidos em ordem cronológica.

O primeiro uso registrado de corrente elétrica em cicatrização tecidual data do século XVII, com o uso de uma folha de ouro carregado eletricamente para diminuir a cicatriz, provocadas pela varíola (NELSON, 2003).

Assimacopoulos, em 1968, realizou um estudo em seres humanos utilizando a estimulação elétrica para a recuperação de feridas. Três pacientes portadores de úlcera venosa crônica na região do pé foram tratados com corrente elétrica contínua, com intensidade variando entre 50 e 100  $\mu\text{A}$  na polaridade negativa. O pesquisador relata o completo restabelecimento em seis semanas de tratamento (ASSIMACOPOULOS, 1968; MERCOLA; KIRSCH, 1995; LAMPE, 1998).

Em 1974, Rowley, Mackenna e Wolcott realizaram um estudo em um grupo de 250 pacientes com úlcera isquêmica e 15 pacientes de controle. Os pacientes estimulados eletricamente tiveram uma aceleração na cicatrização quatro vezes mais rápida do que o grupo controle (MERCOLA; KIRSCH, 1995). No mesmo ano,

Rowley observou que a estimulação elétrica por corrente contínua catódica era bactericida, retardando o crescimento de microrganismos gram negativos e positivos.

Gault e Gatens, em 1976, selecionaram 100 pacientes portadores de úlceras e 76 foram tratados com estimulação elétrica direta de 200 à 800  $\mu\text{A}$ . Foi utilizada polaridade negativa até o controle da infecção e, após a polaridade foi invertida. Os pacientes tratados com estimulação elétrica apresentaram um restabelecimento duas vezes mais rápido que os grupos de controle.

Dueland et al., em 1978, provocaram queimaduras de terceiro grau, nos flancos de oito suínos. Cada animal teve um lado tratado diariamente com uma corrente direta de baixa intensidade de 400 $\mu\text{A}$  com eletrodo de contato por 2 h pela manhã e pela tarde até que a cura ocorresse. A estimulação era catódica em quatro porcos e anódica em outros 4 porcos. Foram realizadas biópsias e culturas semanais dos grupos. O tratamento local com 400 $\mu\text{A}$  não acelerou nem atrasou a cura das queimaduras; e uma infecção superficial por *Proteus* ocorreu em 80% dos casos. Tomaya Ohno, em 1982 (*apud* Van Papendorp e Joubert, 2002), tratou cães com lesões em mandíbula com estimulação elétrica direta de 50  $\mu\text{A}$ . Observou-se o restabelecimento ósseo da mandíbula de forma acelerada.

Na Universidade de Louvain, na Bélgica, em 1982, Cheng et al. realizaram um estudo que se tornou clássico: "*The Effects of Electric Current on ATP Generation, Protein Synthesis and Membrane Transport in Rat Skin*". Neste estudo, Cheng et al. demonstraram que efeitos da estimulação com correntes de baixa intensidade (microamperes) são superiores às correntes na ordem de miliampere. Foram utilizados retalhos de peles de rato machos. Os pelos foram removidos e da parte dorsal dos ratos foram retirados retalhos de pele medindo 5 x 6 cm (largura) e 0,5 mm (espessura) dos tecidos adiposo e subcutâneo. Foram utilizados eletrodos de platina e fio de aço inoxidável para fixar o retalho de pele aos eletrodos. Este sistema foi colocado em um recipiente plástico e submerso na solução de Krebs-Ringer, pH 7,4, contendo 1.000 U de penicilina, 100mg de estreptomicina de 20mg de gentamicina em 100ml. Sobre o retalho de pele foi aplicada corrente elétrica entre 0,01  $\mu\text{A}$  e 30.000  $\mu\text{A}$ , durante uma até duas horas. A corrente contínua foi produzida por duas baterias de 9 V e reguladas por um potenciômetro. As amostras de controle foram submersas, nos mesmos componentes; porém, não foram

estimuladas eletricamente. O maior efeito estimulatório foi observado entre 50 a 1.000  $\mu\text{A}$ , em que a incorporação de glicina aumentou cerca de 75% comparada com o grupo controle. As correntes que excederam 1.000  $\mu\text{A}$  inibiram a síntese de proteínas em torno de 50%.

As correntes constantes entre 100 e 500 $\mu\text{A}$  elevaram o transporte de aminoácidos em 30/40%, enquanto a estimulação com intensidades mais elevadas reduziram a absorção do ácido aminoisobutírico. Com correntes de 10 $\mu\text{A}$ , este ácido reduziu em 73% e a 300  $\mu\text{A}$  a redução chegou a 20%. Nos retalhos incubados, foi adicionada uma mistura de aminoácidos e a eletro-estimulação teve um resultado mais pronunciado (CHENG; HOFF; BOCK, 1982), conforme descrito no quadro 1.

O estímulo elétrico com 100 $\mu\text{A}$  aumentou a incorporação de glicina para 72% e do ácido alfa-aminoisobutírico para 41%, em relação ao retalho de pele não tratado. O estímulo elétrico com 500 $\mu\text{A}$  aumentou a incorporação de glicina para 123% e do ácido alfa-aminoisobutírico para 90%. A síntese das proteínas teve início com 10 $\mu\text{A}$  e do ácido alfa-aminoisobutírico após 100 $\mu\text{A}$ . Com o aumento das correntes elétricas, o efeito inibitório do ácido alfa-aminoisobutírico ocorreu em 750 $\mu\text{A}$ . A eletroestimulação dos tecidos resultou em concentrações notavelmente aumentadas de ATP. Com correntes de 50 $\mu\text{A}$ , os níveis de ATP triplicaram e a 1.0 mA, quintuplicaram. Com correntes de 100 a 500 $\mu\text{A}$ , os efeitos estimulatórios foram similares. Com correntes acima de 1.0 mA, a concentração de ATP foi nivelada e a 5.0 mA, foram reduzidos em comparação ao grupo de controle não tratado. O quadro 2 sintetiza essas informações.

Quadro 1 - Efeito da corrente elétrica na incorporação de glicina nas proteínas e no ácido de alpha-aminoisobutírico pela pele durante a incubação em um meio que contém o aminoácido.

Corrente Elétrica	Incorporação de Glicina (DPM/200g de tecido)		Ácido Alpha Aminoisobutírico (DPM/200 mg de tecido)	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
100 $\mu\text{A}$	7200 $\pm$ 510	12400 $\pm$ 840	20895 $\pm$ 1050	29549 $\pm$ 1840

Fonte: CHENG; HOFF e BOCK, 1982.

Com esse trabalho, Cheng et al. (1982) concluíram que as correntes elétricas diretas variando de 10 a 1.0 mA aumentam a concentração de ATP nos tecidos e

estimulam a incorporação de aminoácido nas proteínas da pele do rato. O transporte do aminoácido é estimulado entre 100 a 750 $\mu$ A. Os efeitos na produção do ATP podem ser explicados pelas modificações nos gradientes elétricos da membrana celular.

Quadro 2 - Os efeitos da eletroestimulação nas concentrações do ATP na pele do rato.

Tratamento Elétrico Corrente $\mu$ A	Concentração de ATP ( $\mu$ mol/gm tecido)
Controle (Sem corrente)	4.2 $\pm$ 0.8
100	16.9 $\pm$ 1.9
500	20.1 $\pm$ 2.2
1000	15.0 $\pm$ 1.8
5000	3.9 $\pm$ 0.6

Fonte: CHENG; HOFF e BOCK, 1982.

Alvarez et al., em 1983, demonstraram a biosíntese do colágeno dérmico e epidérmico, utilizando corrente contínua de 50 a 300  $\mu$ A em porquinhos *yorkshire*. Os autores sugerem que o campo elétrico acelera a proliferação e a migração das células do tecido epitelial e conectivo, envolvidos no processo de regeneração e reparo dos tecidos (ALCA IDA, 1998; ALVAREZ et al., 1983).

Em 1985, Carley e Wainapel selecionaram 30 pacientes com úlceras, divididos em dois grupos de 15. Um grupo foi utilizado como controle e o outro foi tratado com estímulo de corrente direta em amplitudes que variaram entre 200-800  $\mu$ A. Este grupo foi estimulado por períodos de 2 h por 3 dias catodicamente e após anódicamente. Depois de 6 semanas, o grupo tratado com estimulação elétrica apresentou um restabelecimento de 150 a 250% mais rápido, com formação de cicatriz mais resistente, redução de dor e diminuição da infecção na área tratada (KIRSCH, 1995; LAMPE, 1998; ALCAIDE1998; KIRSCH; LERNER, 2002; KIRSCH, 2002; MERCOLA; CARLEY; WAINAPEL, 2003).

Spadaro, Chase e Webster (1986), realizaram uma pesquisa, em que feridas foram inoculadas com *Staphylococcus aureus*, o objetivo era testar a eficiência dos eletrodos de prata no controle da infecção. Foram utilizados eletrodos de prata em 4 aplicações diárias. Ocorreu uma inibição significativa da infecção com um estímulo

de 20 $\mu$ A. A estimulação com eletrodo de prata mostrou-se eficiente na ação antimicrobiana (SPADARO; CHASE; WEBSTER,1986).

Em 1986, Falcone e Spadaro confirmaram os relatórios precedentes que demonstravam uma penetração eficaz do íon de prata e de sua ação antibacteriana. As áreas estimuladas eletricamente com eletrodos de prata mostraram estar livres de bactérias (FALCONE; SPADARO,1986).

Nessler e Mass, em 1987, removeram cirurgicamente oitenta tendões de coelhos brancos, divididos em 4 grupos de vinte animais. O grupo controle não foi tratado (n= 10). Nos grupos de tratamento foi utilizada corrente elétrica com intensidade de 7 $\mu$ A. Os grupos tratados apresentaram como resultado um incremento na atividade celular do tendão dentro de 7 dias, persistindo por 42 dias (NESSLER; MASS, 2003).

No mesmo ano, Oweye, Spielholz, Fetto e Nelson removeram cirurgicamente o tendão de Aquiles de 60 ratos e os dividiram em três grupos de vinte. O primeiro grupo não foi tratado, o segundo teve seus tendões de Aquiles estimulados com polaridade positiva e o terceiro grupo com polaridade negativa. Foi aplicada uma corrente elétrica com intensidade de 75  $\mu$ A e frequência de 10 Hz, por 15 sessões, duas vezes por semana. O grupo que melhor respondeu foi aquele tratado com estimulação anódica (NESSLER; MASS, 2003; OWOEYE; SPEIHOLZ,1985)

Weiss, Eaglestein e Falanga, em 1989, estudaram o efeito da estimulação elétrica com polaridade positiva na espessura resultante da cicatriz das feridas cirurgicamente induzidas e relataram que a eletroterapia reduz a espessura e a formação hipertrófica da cicatriz (WEISS; KIRSNER; EAGLSTEIN, 2003).

No ano seguinte, Weiss et al. descreveram num artigo no qual examinam as propriedades bioelétricas dos sistemas vivos e reviram a literatura existente sobre a estimulação elétrica, a cura acelerada das feridas e as propriedades tensoras dos tecidos expostos às correntes elétricas (SPADARO; CHASE; WEBSTER,1986).

Uezono, em 1990, na Universidade de Kagoshima no Japão, observou que o estímulo de 100 $\mu$ A com eletrodos de prata mostrou-se eficaz no controle da bactéria *Staphylococcus Aureus* (UEZONO, 2003).

Sersa et al., em 1992, estudaram os efeitos anti-tumorais da estimulação elétrica associada à interleucina-2, utilizaram o cátodo inserido no tumor e ânodo ao

redor do tumor, aplicando intensidade de corrente de 400, 600, 1400 e 1800 $\mu$ A e verificaram uma redução do crescimento do tumor (ALCAIDE,1998).

Wood, Evans e Schallreuter em 1992 trataram 43 pacientes com úlcera de decúbito crônica por meio de corrente elétrica pulsada com amplitudes entre 300 e 600  $\mu$ A a 0,8 Hz de frequência, inicialmente com polaridade negativa. O resultado alcançou 58% do grupo tratado com cura em 8 semanas (LAMPE,1998).

Pleniscar et al., em 1994, estudaram cinco pacientes com metástase ou lesões cutâneas de melanoma primário, aplicando corrente contínua catódica de baixa intensidade, ao nível de 1000 $\mu$ A, por 30 min. Após doze aplicações, observou-se regressão do tumor em todas as lesões cutâneas do melanoma (ALCAIDE, 1998).

Em 1994, Byl et al., na Universidade de São Francisco, USA, realizaram um estudo em feridas de porcos, sob controle, utilizando corrente elétrica pulsada de 100 $\mu$ A em 0,1 Hz de frequência, com tempo de aplicação de 1 h durante 5 dias consecutivos. Os resultados não mostraram efetividade da estimulação elétrica na cicatrização das feridas (BYL, 2003).

Em 1995, Bertolucci e Grey (apud Andersen, 2004) trataram 48 pacientes com doença degenerativa temporomandibular, os quais foram divididos em três grupos: um grupo recebeu placebo, outro foi tratado com estimulação elétrica de baixa intensidade e um terceiro foi tratado com LASER. Os grupos tratados com estimulação elétrica e LASER tiveram efeitos mais significativos que o grupo tratado com placebo, sendo o grupo do laser ligeiramente mais efetivo do que aquele com estimulação elétrica.

Chu et al., em 1996, no Texas, USA, realizaram uma pesquisa em fase aguda de queimaduras provocadas em ratos. Aplicaram corrente contínua entre 4 e 40  $\mu$ A e observaram que a corrente tem um efeito benéfico na redução do edema. Quando aplicada nas primeiras 8 h, produz um menor acúmulo de edema, mas a redução mantém-se significativa mesmo quando aplicada após 36 h depois de ocorrida a queimadura.

Em setembro do mesmo ano, esses pesquisadores realizaram outro trabalho com o objetivo de observar os efeitos da corrente direta a 40 $\mu$ A no extravasamento de albumina do plasma sanguíneo após uma queimadura e concluíram que a

corrente contínua tem um efeito benéfico em reduzir o extravasamento da proteína do plasma após uma queimadura (MATYLEVICH; CHU, 2003).

Baker et al., em 1997, estudaram os efeitos de duas formas de onda em oitenta pacientes com úlceras abertas em decorrência de diabetes. Um grupo foi estimulado com uma forma de onda bifásica assimétrica, outro com bifásica simétrica e o terceiro grupo não recebeu estimulação. O grupo estimulado com forma de onda bifásica assimétrica obteve aumento significativo da taxa de cura em quase 60%, em um período de tratamento de 3 meses, quando comparado ao grupo controle. A estimulação com a forma de onda bifásica simétrica não aumentou a taxa de cura quando comparado com o grupo de controle. Concluíram que a estimulação elétrica diariamente com a forma de onda bifásica, pulsada, assimétrica curta foi eficaz para o aumento da taxa de cura em pacientes com úlceras abertas em decorrência de diabetes.

Dunn et al. (1988) examinaram o efeito da corrente contínua na matriz do colágeno implantada em feridas dérmicas de porcos da Índia e descobriram que a corrente contínua de baixa intensidade (cátodo sobre a ferida) aumentou a migração de fibroblastos e estimulou o realinhamento de colágeno, enquanto que com o ânodo sobre a ferida atraiu as células inflamatórias (DUN, 1988; BRAGA et al., 2002).

Preocupados em evidenciar os efeitos da estimulação elétrica na cicatrização de feridas crônicas, Gardner et al. (1999) desenvolveram uma meta-análise para quantificar os efeitos da estimulação elétrica relacionando o tipo de estímulo elétrico e o tipo de úlcera. Foram selecionados 15 estudos, enquadrados dentro dos critérios de inclusão: estudos clínicos que utilizaram estimulação elétrica em úlceras crônicas e que relatassem dados quantitativos do tamanho da ferida antes e após o tratamento ou ainda um relatório do percentual de cicatrização por semana. A especificidade desta meta-análise foi calcular e comparar a taxa de cicatrização de diferentes tipos de feridas crônicas com diversos tipos de estimulação elétrica em 15 estudos. Como conclusão os autores afirmam haver evidências de que independente do tipo de estimulação, a maioria das experimentações clínicas avaliadas demonstram eficiência deste recurso no processo de cicatrização de feridas. O percentual de cicatrização por semana foi de 22% nos grupos tratados com estimulação elétrica contra 9% de cicatrização dos grupos controles.

No ano de 2000, Bogie et al. apresentaram um estudo que revê as aplicações específicas da estimulação elétrica terapêutica para cura de feridas e prevenção de úlceras de pressão. Os estudos preliminares foram realizados em dois centros de pesquisa para avaliar o papel da estimulação elétrica na prevenção de úlceras de pressão. Os estudos mostraram que a estimulação elétrica nas feridas provocou um aumento na taxa de cura em mais de 50%, e pode produzir mudanças positivas em curto prazo, tal como o aumento do fluxo sanguíneo (BOGIE et al., 2003).

Kloth (2005) constatou, em uma revisão de literatura, as evidências da estimulação elétrica na cicatrização de pele. Avaliou aspectos relacionados ao mecanismo de ação da estimulação elétrica no metabolismo celular, na galvanotaxia, efeitos antibactericidas e resultados clínicos em úlceras de perna. Baseado nos achados *in vitro*, conclui que a estimulação elétrica nas células da pele, produziram a abertura dos canais de cálcio ( $Ca^{+}$ ) da membrana celular do fibroblasto com conseqüente impregnação da insulina e TGF- $\beta$ , aumento na produção de colágeno e na síntese de DNA. Com relação à galvanotaxia as investigações demonstraram que as células envolvidas nas lesões de pele migram em direção ao ânodo ou ao cátodo, dependendo do tipo de célula. Os estudos que evidenciaram os efeitos antibactericidas da estimulação elétrica indicam resultados positivos sobre feridas infectadas quando utilizados intensidades na ordem de microamperes. Os experimentos clínicos demonstraram que a estimulação elétrica combinada com cuidados com a ferida tem resultado positivo para várias feridas de diferentes etiologias.

Sonnewend et al. (2006) estudaram os efeitos de duas doses de estimulação elétrica na cicatrização de feridas. Neste estudo, os autores utilizaram 21 ratos *Wistar*, separados em um grupo controle (GC) e dois grupos tratados com intensidades de 30 $\mu$ A e de 160 $\mu$ A com frequências de 0,3 Hz e 0,8 Hz. Os animais sofreram uma lesão no dorso e foram tratados com uma única sessão de estimulação elétrica com forma de onda quadrada, bifásica, simétrica balanceada, com um tempo de aplicação de 30 min. A redução do diâmetro da ferida foi verificada entre 48 e 168 h após a cirurgia. A contagem de fibroblastos foi um outro parâmetro de análise. Os autores observaram que o grupo tratado com 160 $\mu$ A apresentou uma aproximação das bordas da ferida, estatisticamente significativo em

relação ao controle no período de 72, 144, e 168 h, enquanto o grupo de 30 $\mu$ A apresentou diferença significativa no período de 144 e 168 hs. A contagem de fibroblastos apresentou significância no grupo de 160 $\mu$ A, o grupo de 30 $\mu$ A não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Charles Godbout e Jérôme Frenette (2006) desenvolveram um estudo para validar a hipótese que a corrente direta acelera o fechamento da ferida. Usando um modelo dinâmico *in vitro* de migração celular, este estudo utilizou corrente direta em várias intensidades (85; 120; 165; 215  $\mu$ A) e com reversão periódica da polaridade. A avaliação foi realizada durante 8 h, em diferentes momentos. No grupo controle foram utilizados os mesmos critérios, porém sem a aplicação de corrente elétrica. Para a análise foi utilizado um vídeo microscópio, que capturou as imagens das células a cada 30s e foram realizados cálculos sobre o tempo de movimento das células. A direção do movimento do fibroblasto foi avaliado, medindo o valor do cosseno do ângulo entre a posição da célula no início e no final do protocolo. Os resultados mostraram que a estimulação elétrica não apresentou resultados na migração celular e a estimulação prolongada, com maior intensidade, foi responsável por uma redução no fechamento da ferida.

## 2.3 LASER<sup>1</sup>

O fenômeno físico que envolve a emissão estimulada tem origem com o trabalho publicado por Albert Einstein, em 1917, intitulado *Zur Quantun Theorie der Strabing* (PIMENTA, 1990).

Vários prêmios Nobel foram conferidos na década de 60 para estudos sobre laser. Na área de saúde, a terapia com laser de baixa potência começou a ser estudada no final da década de 60, início da década de 70, sendo que um dos pioneiros no uso do laser de baixa potência foi o Professor André Mester (1995), também conhecido como o pai da bioestimulação. Seu grupo de estudos desenvolveu pesquisas em animais e ensaios clínicos, indicando que o potencial de irradiação laser de intensidade baixa, aplicada diretamente ao tecido poderia

---

<sup>1</sup> O termo laser é abreviação do termo inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* sendo então o seu principio de geração fundamentado na amplificação da luz por Emissão Estimulada de Radiação (LOOW; REED, 2001).

modular alguns processos biológicos, particularmente, a regeneração de tecidos (KITCHEN; BAZIN, 2003).

Nos últimos 15 anos ocorreu um aumento progressivo de estudos e uso clínico do laser de baixa potência (laserterapia) em inúmeras situações, incluindo o tratamento de lesões de tecidos moles, doenças articulares, lesões tendíneas, dores e feridas abertas (BAXTER et al., 1991).

### **2.3.1 Princípios Físicos**

A produção da radiação LASER ocorre pela energização do átomo, a partir da passagem do elétron de um estado de menor para um estado de maior energia, caindo novamente para um estado de menor energia.

De uma forma simplificada, poder-se-ia descrever que existem dois estados de energia: estado ( $E_1$ ) de menor energia e um estado excitado de maior energia ( $E_2$ ), depois de algum tempo, esses elétrons energizados irão cair para o estado  $E_1$  espontaneamente, emitindo um fóton de luz. Os fótons emitidos têm propriedades que são determinadas por diferentes níveis de energia de onde o elétron excitado “caiu”. Em condições normais, os átomos de um material têm um número maior de elétrons no nível de menor energia. Quando este material é bombardeado com fótons, os átomos deste material irão absorver o fóton e os elétrons irão para estados superiores de energia, o átomo mais excitado do que o normal é uma condição básica para geração do efeito laser. O mecanismo de bombeamento, além de excitar os átomos (ou moléculas), deve ser capaz de produzir inversão de população entre dois níveis quaisquer de energia, geralmente acima do estado fundamental. Finalmente, a realimentação faz com que a radiação efetue múltiplas passagens de ida e volta através do meio ativo, aumentando a eficiência de geração de fótons por emissão estimulada. Os processos de bombeamento mais utilizados para produzir inversão de população são descargas elétricas em gases e bombeamento óptico. No primeiro caso, os mecanismos físicos envolvidos no bombeamento são as colisões diretas de elétrons com átomos e a transferência de energia por colisões entre átomos diferentes (PÉCORA; BRUGNERA, 2003).

Para que isso ocorra, o material que produz o laser deverá estar em uma cavidade óptica, composta de dois espelhos cuidadosamente alinhados, de modo tal que a radiação laser reflita de um lado para o outro. Um dos espelhos é parcialmente refletor, para permitir que a radiação seja emitida (PIMENTA, 1990).

Meios sólidos, líquidos e gasosos têm sido utilizados para produzir luz LASER em comprimentos de ondas específicos (COLLS, 1984).

O comprimento de onda de uma radiação laser é determinado pelo meio usado para produzi-la, dependendo do tipo de estimulação são derivados componentes de ondas diferentes e, conseqüentemente, diversos tipos de LASER.

### 2.3.2 Características

O LASER é um tipo de energia luminosa que possui características muito próprias que o diferenciam de outras fontes similares. É uma radiação não ionizante, monocromática, colimada e polarizada (PIMENTA, 1990; KITCHEN; BAZIN, 2003).

A monocromaticidade relaciona-se ao comprimento de onda da radiação LASER e conseqüentemente os efeitos terapêuticos produzidos pela mesma. O comprimento de onda e a energia do fóton relacionam-se à constante de Planck, na qual há uma razão diretamente proporcional entre a energia e a freqüência, de acordo com a equação (1) (COLLS, 1984):

$$E = h.f = hc/\lambda \quad (1)$$

Onde:

E: energia (J)

h: constante de Planck (Js)

f: freqüência (Hz)

c: velocidade da luz no vácuo ou no ar (m/s)

$\lambda$ : comprimento de onda (m)

A colimação refere-se à característica do feixe de LASER ser extremamente organizado e se propagar na mesma direção, com cristas alinhadas e orientadas num só plano; este grau de paralelismo, uniformidade e pouca dispersão possibilitam a utilização da radiação laser (BAXTER, 1997).

A coerência representa o sincronismo das ondas de luz devido a emissão ordenada. A radiação laser é coerente no tempo e no espaço, sendo, então, unidirecional, permanecendo em fase por longas distâncias e com pouca dispersão (BAXTER, 1997).

### 2.3.3 Parâmetros de Irradiação LASER

O uso do LASER como alternativa na terapêutica clínica foi proposto inicialmente pelo professor André Mester, no final da década de 60 (MESTER, E.; MESTER, A. E.; MESTER, A, 1985).

Os efeitos da radiação LASER nos tecidos biológicos relacionam-se ao comprimento de onda, ao tipo de pulso, à densidade de energia e frequência de tratamento. Esses efeitos abrangem desde bioestimulação até ablação cirúrgica (BAXTER, 1997; LOOW; REED, 2001).

O quadro 3 relaciona os diferentes tipos de emissão, seus respectivos comprimentos de onda, tipo de pulso e efeitos.

Quadro 3 – Tipos de emissão, comprimentos de onda, pulso e indicações do LASER.

MATERIAL	COMPRIMENTO DE ONDA Nm	REGIME DE PULSO	INDICAÇÃO
<b>CRISTAIS</b>			
Rubi	694	Pulsado/Contínuo	Remoção de tatuagem/pêlos
Alexandrite	755	Pulsado	Remoção de pêlos
Neodímio-YAG	1064	Pulsado	Coagulação de tumores
Hólmio-YAG	2130	Pulsado	Endodontia
Érbio-YAG	2940	Pulsado	Peeling
<b>SEMICONDUCTORES</b>			
AlGaInP	630-685	Contínuo	Bioestimulante
AsGaAl	780-870	Contínuo	Bioestimulante
AsGa	904	Pulsado	Bioestimulante
<b>GASES</b>			
Eximeros	193/248/308	Pulsado	Cirurgia vascular e oftálmica
Argônio	350-514	Contínuo	Cirurgia oftálmica e dermatológica
Vapor de Cobre	578	Pulsado/Contínuo	Cirurgia dermatológica
HeNe	632,8	Contínuo	Bioestimulante
CO <sub>2</sub>	10600	Pulsado/Contínuo	Cirurgia Dermatológica

Fonte: TUNER e HODE, 1999.

Os LASERS terapêuticos apresentam comprimentos de onda na faixa do visível e do infravermelho. As emissões infravermelhas estão entre os comprimentos de onda de 770nm e 1300nm, produzidos a partir do Arseneto de gálio (As-Ga), e do Arseneto de gálio alumínio (AsGaAl). A emissão visível, por sua vez, apresenta comprimento de onda na faixa de 632,8 nm e potência, entre 1 e 10 mW (BAXTER,1997).

De acordo com Karu (1998), os comprimentos de onda na faixa entre 810 nm a 840 nm apresentam maior profundidade de penetração, em função dos cromóforos superficiais apresentarem pouca absorção nesta faixa do espectro luminoso (KARU,1998).

Meireles (2005) desenvolveu um estudo controlado, utilizando emissão de de AsGaAl com comprimento de onda de 660nm e 780nm no reparo de queimaduras em dorso de ratos diabéticos e não diabéticos. O resultado demonstra um efeito mais evidente no grupo tratado com 660nm nos animais não diabéticos, sendo que o comprimento de onda de 780nm foi mais efetivo no grupo de animais diabéticos.

A utilização do LASER terapêutico tem sido aplicada desde a sua concepção. Embora existam mais de uma centena de LASERs ativo, somente alguns são utilizados em aplicações clínicas (SILFAST, 1996).

O LASER de Rubi pulsado foi o primeiro material a demonstrar aplicação em medicina, desenvolvido em 1960 com o objetivo de tratar deslocamentos de retina. A partir de então, pesquisadores do mundo todo desenvolveram ampla gama de materiais capazes de emissão de radiação laser (SILFAST, 1996).

A maior parte das aplicações médicas utiliza a radiação laser na forma de calor. O aumento da temperatura tecidual decorre da vibração rápida de átomos e moléculas induzidas por fótons de baixa energia (região infra-vermelho).

Segundo Ribeiro (1991), a penetração da radiação laser, em geral, diferencia-se no tecido de granulação de úlceras de pele, quando comparado à pele normal. A penetração no tecido de granulação chega a aproximadamente 2,5 vezes mais que a penetração da pele normal de espessura similar.

De maneira geral, há aumento gradativo da profundidade de penetração do laser na pele quando seus comprimentos de onda são mais longos. Os

comprimentos de onda mais penetrantes ficam na região do vermelho (He Ne) e o Arseneto de Gálio, perto do infravermelho.

A profundidade de penetração e absorção da radiação LASER é de difícil quantificação em função da complexidade das camadas da pele. Cada extrato cutâneo comporta-se de forma diferenciada em relação à reflexão, absorção, transmissão e dispersão (PARRISCH; ANDERSON, 1983).

A reflexão na pele pode ocorrer entre os diferentes extratos, em função da diferença do índice de reflexão. Já a absorção relaciona-se com o comprimento de onda e cor do tecido irradiado, desta maneira, o LASER de HeNe é mais absorvido por tecidos vascularizados e o de As Ga por tecidos pouco vascularizados (GUIRRO; GUIRRO,2000). Outro parâmetro corresponde à refração que é uma mudança na direção à medida que atravessa os tecidos com diferentes índices variáveis de refração (BAXTER, 2003).

O estudo de Melo et al. (2001) ressaltam que os coeficientes de absorção e refração são essenciais para avaliar a penetração do LASER nos tecidos. Os autores chegaram a esta conclusão através de um estudo experimental animal, onde foram gravadas imagens da dispersão da radiação LASER. Foram utilizados dois comprimentos de onda (630 nm e 514 nm), sendo que todos os tecidos irradiados demonstraram a característica isotrópica da dispersão e como conseqüência, a diminuição da intensidade. Quando os autores analisaram e compararam a profundidade de penetração do laser em fígados saudáveis, comparados a fígados cirróticos, observaram uma penetração 4 vezes maior nos fígados normais. A fibrose característica dos estados de regeneração hepática pode explicar o aumento da dispersão da radiação (MELO, 2001).

A relação de profundidade de penetração do laser com diversas porcentagens de energia são ressaltadas em muitos estudos (DIEZ DE LOS RIOS,1987).

Apesar da complexidade em se determinar índices de penetração, Prochazka (2000) afirma que as radiações LASER com potência na faixa de 30mW com emissão no espectro do infravermelho, conseguem penetrar alguns centímetros (PROCHAZKA, 2000).

Tunér e Hode (2000) são mais específicos afirmando que o LASER de As-Ga alcança profundidade de 20 a 50 mm e que no de He Ne a penetração é de 0,8 mm (TURNER; HODE, 2000).

Para Tunér e Hode (2000), a densidade de energia e a densidade de potência são importantes para determinar a profundidade de penetração da radiação LASER (TURNER; HODE, 2000).

A densidade, também conhecida como irradiância representa a concentração de potência de saída medida em  $W/cm^2$ . A densidade de energia, também conhecida como fluência ou dose, significa a energia por centímetro quadrado de luz que é dirigida para uma área (TURNER; HODE, 2000). Percebe-se, portanto, que existe uma relação de proporcionalidade direta entre a energia radiante e a potência do equipamento, sendo a potência diretamente proporcional à variação de energia emitida e inversamente proporcional ao intervalo de tempo de aplicação, como pode ser observado pela equação (2) (COLLINS, 1998).

$$P = \Delta E / \Delta t \quad (2)$$

Na qual:

P: potência média (W)

$\Delta E$ : variação da energia (J)

$\Delta t$ : intervalo de tempo (s)

Segundo Sandoval-Ortiz et al. (2001), a dose adequada para utilização terapêutica dos LASERS de baixa potência ainda permanece em discussão.

O cálculo da dose deve levar em consideração vários fatores como: a distância entre a pele e o aparelho, a área total irradiada, o tipo de lentes ou espelhos utilizados no aparelho, o tipo de fonte, a potência de saída, a divergência do feixe, assim como a sua reflexão, transmissão, dispersão e absorção, profundidade do tecido tratado e, finalmente, o tempo de aplicação (BECKERMAN, 1992), assim como a técnica de aplicação.

Pesquisadores como Lubart (1993), Somer (2001), Freitas (2000), defendem a idéia que efeitos fisiológicos são dependentes da dose.

O efeito dose-dependente é explicado por um modelo conhecido como lei de Arndt-Schultz, cuja teoria é representada pela curva dose *versus* resposta representada na Figura 1.

Em estudos de Karu (1995,1998), o efeito dependente da dose é demonstrado pela avaliação da mitose celular, a curva apresentava-se com um limiar, um máximo e uma fase de descendência, comportando-se como na lei de Arndt-Schultz. Esse comportamento, porém, não se repetiu nas bactérias. Neste caso, ocorria uma segunda fase, que dependia do tempo de exposição (KARU, 1998).

A dose de irradiação ou densidade de energia é o parâmetro mais importante na laserterapia. Se a dose for muito alta (acima de  $10 \text{ J/cm}^2$ ), ou muito baixa (menos que  $0,1 \text{ J/cm}^2$ ) não se produz efeitos de estimulação. Porém, deve-se considerar que o efeito da irradiação é cumulativo ao longo de aplicações (KARU, 1989; SILVA, 2003).

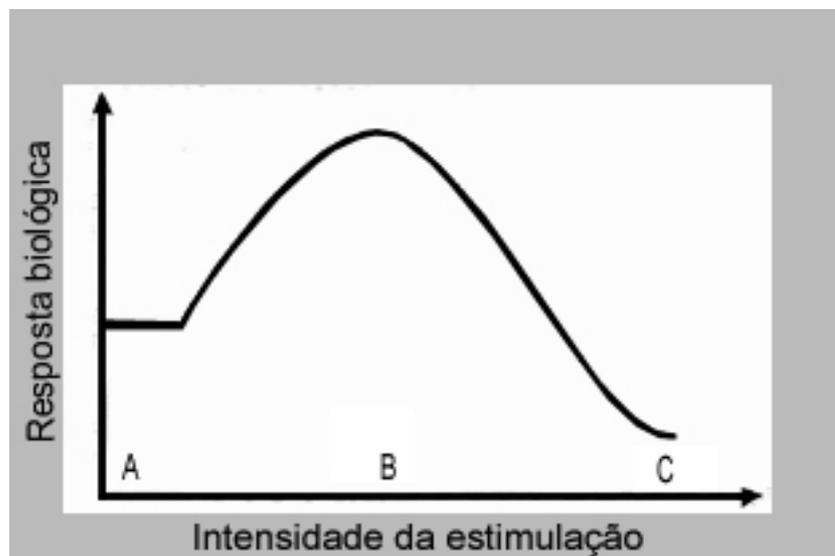


Figura 2 - Lei de Arndt-Schultz, A: pré-limiar (repouso). B: Bioestimulação. C: Bioinibição  
Fonte: Adaptada de Baxter, 2003.

O estudo de Silva (2003) também defende que a dose de radiação é fator decisivo na modulação da resposta biológica, podendo ser protetora ou deletéria. A autora realizou uma pesquisa experimental, em que irradiação com laser de HeNe na dose de  $3,5 \text{ J/cm}^2$  exerceu ação protetora no tecido muscular, contra a ação

miotóxica induzida por veneno (B. Jararacussu), enquanto na dose de  $10,5 \text{ J/cm}^2$ , ocorreu uma ação deletéria muscular (SILVA, 2003).

Como já ressaltado em parágrafo anterior, a absorção depende, principalmente, da constituição do tecido irradiado. Esta consiste no fator mais importante, no que diz respeito aos efeitos biológicos e fisiológicos da aplicação do laser na área da saúde. A absorção nos tecidos depende de uma biomolécula que, em função da sua configuração eletrônica, é capaz de ser excitada por fótons incidentes. Este cromóforo transforma esta energia e desencadeia os efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (KARU, 1998; BAXTER, 2003).

O processo de absorção ocorre quando o fóton cede sua energia para moléculas que apresentam faixas características de absorção, esta estrutura-alvo também conhecida com o nome de cromóforo tem transições específicas entre as órbitas eletrônicas que favorecem a absorção (KARU, 1989).

Segundo Anderson e Parrish (1981), o coeficiente de absorção é a probabilidade de um fóton ser absorvido por unidade de comprimento de trajeto. O coeficiente de absorção depende da concentração dos cromóforos presentes no tecido (ANDERSON; PARRISH, 1981).

Na epiderme, a absorção nas ligações peptídicas das proteínas e o DNA ocorrem mais intensamente em comprimentos de onda ultra-violeta abaixo de 300 nm. A absorção pela melanina ocorre nos comprimentos de onda de 320 a 1200 nm. No sangue, a absorção é reduzida pela oxihemoglobina e pela hemoglobina-reduzida, mais intensamente na faixa de 600 a 1200 nm (ANDERSON; PARRISH, 1981). Na figura 2, é possível observar os principais cromóforos e seus respectivos espectros de absorção.

#### **2.3.4 Interação com Tecido Biológico**

Acredita-se que o laser de baixa intensidade seja responsável por efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células e tecidos. A interação da luz com tecidos e células pode estimular ou inibir determinadas funções celulares. Este efeito parece ser particularmente evidente se a célula irradiada estiver com suas funções debilitadas (KARU, 1989). Túner e Hode (1999) também descrevem em seu

trabalho que a radiação laser de baixa intensidade tem efeitos mais evidentes sobre órgãos e tecidos enfraquecidos, assim como em pacientes que sofrem alterações funcionais nos tecidos.

O contato inicial da radiação LASER ocorre no extrato córneo, da epiderme, sendo que cerca de 5 a 7% da radiação é refletida (PARRISH; DEUTSCH, 1984). Proporcionalmente à absorção e à dispersão da radiação, ocorre a atenuação dos efeitos nos tecidos biológicos (OHSHIRO, 1991).

Os efeitos estimulantes do laser nos tecidos biológicos são explicados por várias teorias.

Segundo Wilden e Karthein (1998), a radiação laser estimula componentes da cadeia respiratória ativando o metabolismo celular por intensificação da produção mitocondrial de ATP (WILDEN; KARTHEIN, 1998).

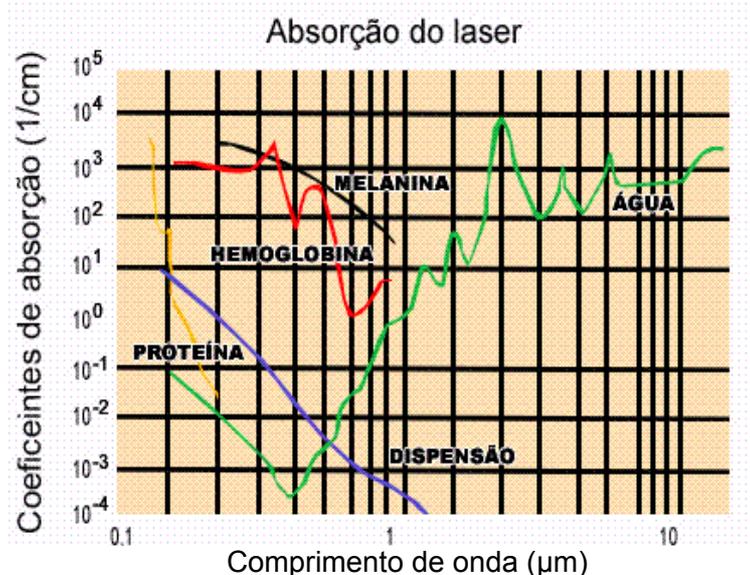


Figura 3 – Espectro de absorção dos principais cromóforos da pele.  
Fonte: Adaptada de ANDERSON e PARRISH, 1983.

A teoria fotoquímica é demonstrada em um modelo de Karu (1989), no qual o autor observa que a radiação LASER produz mudanças químicas em fotorreceptores das mitocôndrias, alterando o metabolismo e conduzindo à transdução (processo de transferência de energia de um sistema para o outro) do sinal a outras partes da

célula que, finalmente, conduzem à foto-resposta (biomodulação). Smith (1991) sugere modificações no modelo de Karu (1989) propondo que os efeitos foto físicos da radiação infravermelha, iniciariam a cascata de eventos metabólicos nos canais de cálcio da membrana celular.

Os fotorreceptores ou cromóforos seriam as estruturas responsáveis por transformar a energia eletromagnética em energia química. São um grupo de moléculas que podem ser enzimas, membranas ou qualquer outra substância capaz de absorver a luz (KARU,1998). Baxter (1997) diferencia os fotorreceptores dos cromóforos, classificando os ácidos nucléicos e aminoácidos como responsáveis por absorver a luz e a melanina e a hemoglobina como cromóforos, os quais teriam seu espectro de absorção na faixa da luz visível do espectro, enquanto os fotorreceptores teriam alta absorção nos comprimentos de onda menores que do ultravioleta.

Sandoval-Ortiz et al. (2001) afirmam que a teoria fotoquímica é mais fundamentada para explicar a reação das células à luz. Em estudos mais recentes, Karu (2000) refere-se às ações primária e secundária da radiação. As reações secundárias podem ocorrer horas ou até dias após a irradiação e são creditadas à enzima citocromo c oxidase como possível fotorreceptor, quando as células são irradiadas com luz monocromática. A autora propõe cinco mecanismos primários, como resultado da fotoexcitação: mudanças nas propriedades redox dos componentes da cadeia respiratória com liberação de óxido nítrico (NO), formação de oxigênio molecular, aquecimento transitório local de cromóforos absorvedores, proporcionando alterações na atividade bioquímica e estrutural e aumento na produção de superóxido com aumento subsequente na concentração dos produtos de sua dismutação,  $H_2O_2$ . No esquema ilustrado na figura 3, foram relacionados os cinco mecanismos citados por Karu.

As reações físico/químicas iniciais induzidas pela luz nos cromóforos, são seguidas por uma cascata de reações celulares que levam à homeostase celular. O responsável por desencadear este processo de homeostasia é o estado redox, já que o mesmo desempenha um papel de equilíbrio, proporcionando redução, ligada à inibição celular e à oxidação associadas à estimulação celular. As células com pH mais baixo (estado redox reduzido) são consideradas mais sensíveis à ação

estimuladora da luz, quando comparadas com aquelas em que os parâmetros são considerados ótimos. O mecanismo de regulação redox pode explicar alguns efeitos clínicos da radiação, por exemplo, os resultados positivos alcançados no tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambas caracterizadas por acidose (pH diminuído) e hipóxia ( $pO_2$ , pressão parcial de oxigênio diminuída) (KARU, 2000).

### **2.3.5 Aplicação da Terapia com LASER**

Na literatura, encontra-se a indicação que o laser de baixa potência apresenta efeitos e aplicações variadas na prática clínica, incluindo a estimulação de regeneração de feridas, o tratamento de disfunções articulares e lesões de tecido mole, bem como no alívio da dor (BAXTER, 2003).

Na tentativa de compreender melhor estes efeitos, numerosos estudos *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos vêm sendo realizados (YU et al. 1994; Karu, Pyatibrat; Kalendo, 1995; KARU, 1998; SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001). Apesar destes e do largo uso clínico, segundo Herascu et al. (2005) ainda existem controvérsias sobre a eficácia desse tratamento na prática clínica. Baxter (2003) alerta que, muito dos resultados apresentados até agora, são mal controlados com casuística relativamente pequena, e com resultados contraditórios.

No Brasil, depara-se com um agravante com relação à eficácia clínica dos LASERs de baixa potência. Em estudo realizado por Bertolini & Nohama (2003), constatou-se que os equipamentos utilizados no estado do Paraná apresentavam precárias condições para o uso clínico, do total de aparelhos avaliados, 61,29% encontravam-se fora dos padrões de potência irradiada. Os valores nominais não coincidiam com as medidas encontradas nos testes realizados.

A pesquisa celular tem sido utilizada por diversos estudiosos, para avaliar os efeitos da radiação LASER de baixa potência e suas bases para uso clínico, principalmente, na promoção e regeneração de feridas. Porém, segundo Baxter (2003), a correlação destes estudos com a prática clínica é difícil, em função da diferença e complexidade de um microambiente clínico, comparado aos modelos biológicos utilizados em laboratório.

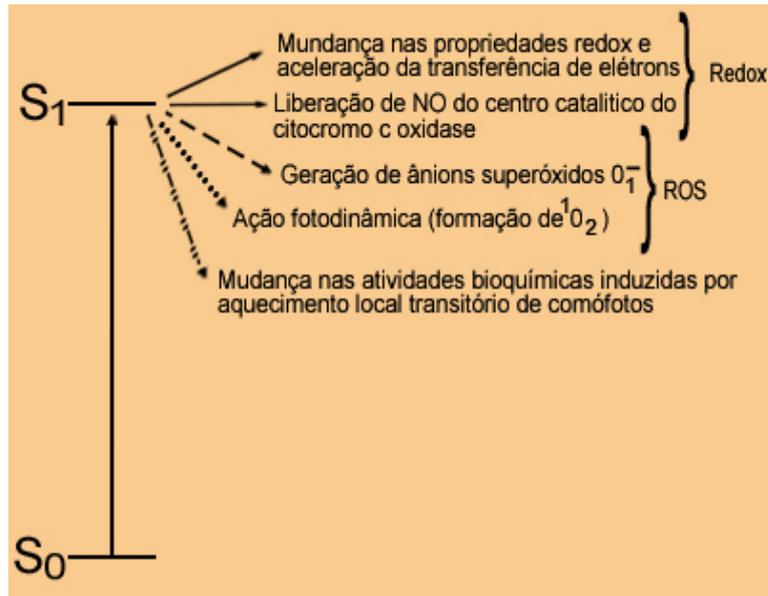


Figura 4 - Possíveis reações primárias com cromóforos na cadeia respiratória celular

Fonte: Adaptado de KARU, 2000.

Passarella et al. (1984) observaram que a radiação LASER de baixa potência é capaz de gerar potenciais eletroquímicos na membrana celular e afirmam que estes potenciais são responsáveis pela normalização da atividade da membrana. O estudo foi realizado aplicando LASER de HeNe a  $5 \text{ J/cm}^2$  em mitocôndrias de hepatócitos.

Em 1988, Mester E., Mester A.E. e Mester A., por meio de um estudo *in vitro*, atribuem à radiação LASER o aumento da formação de colágeno e aumento da síntese de D.N.A.

Os efeitos do laser sobre a ativação de mediadores químicos ligados ao processo de reparação tecidual também foi observado por um estudo *in vitro* realizado por Yu et al. (1994), em que foram investigados a produção do fator de crescimento transformador ( $TGF\beta_2$ ) e do fator derivado de plaquetas (PDGF) de fibroblastos irradiados com laser em vários comprimentos de onda: 630, 640, 650, 660 nm. Todos os valores testados aumentaram os fatores de crescimento em relação ao controle. Além da conclusão deste estudo sobre o aumento do  $TGF\beta_2$  e do PDGF, os autores sugerem que a bioestimulação pelo laser pode estar associada à regulação das células via produtos autócrinos dos diferentes fatores de crescimento.

Karu, Pyatibrat e Kalendo (1995) pesquisaram os níveis de ATP em células *in vitro*, após a utilização da radiação LASER de HeNe com comprimento de onda de 632,8 nm com densidade de potência de 100 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados mais evidentes ocorreram após 20 min da irradiação, chegando a um aumento de 170,8%, após este máximo atingido, o nível de ATP foi diminuindo lentamente até chegar ao índice do controle.

Lubart et al. (1992) avaliaram o efeito de vários comprimentos de onda sobre a mitose em culturas de fibroblastos e observaram que utilizando LASER com comprimento de onda de 632 nm, ocorreu um significativo aumento, em comparação ao controle. O máximo resultado foi alcançado com uma dose de 15 J/cm<sup>2</sup>. Com doses acima de 60 J/cm<sup>2</sup>, o número de mitoses diminuiu.

Em 1997 Manteifel, Bakeeva e Karu irradiaram linfócitos com LASER de HeNe com potência de 6 mW, densidade de 5,6 W/cm<sup>2</sup> e densidade de energia de 56 J/cm<sup>2</sup>. O objetivo era observar se a ativação funcional da mitocôndria seria acompanhada de mudanças estruturais. O achado importante deste trabalho está na observação de mitocôndrias gigantes (85%) em relação ao grupo controle, justificando os achados de outros trabalhos já citados que evidenciaram o aumento da síntese de ATP.

Os estudos de Van Breugel e Bar (1992) evidenciaram a fotobiomodulação de fibroblastos *in vitro* e mostraram que o espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos possui várias bandas de absorção, entre elas, uma centrada em 630nm.

Nas pesquisas realizadas em animais, um dos principais aspectos de estudo tem sido os efeitos da bioestimulação na regeneração de feridas e o reparo de tecidos (BAXTER, 2003).

O estudo experimental de Buerger et al. (2004) teve como objetivo verificar, através de análise histológica, a ação do LASER terapêutico de baixa potência no processo de regeneração de uma lesão experimental por esmagamento do nervo ciático de ratos. Na metodologia, foram utilizados 18 ratos jovens, machos, da linhagem *Wistar*, divididos em 3 grupos de igual número, sendo que os três grupos foram submetidos a lesão por esmagamento do nervo ciático. O primeiro grupo não foi irradiado com o laser (grupo controle); o segundo foi irradiado com LASER de

baixa potência durante 21 dias intercaladamente; e o terceiro grupo foi irradiado com LASER de baixa potência diariamente (durante os 21 dias). Foram realizadas aplicações com o LASER de Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (GaAlInP), com a técnica pontual em 12 pontos perpendiculares de acordo com o trajeto do nervo. Após 21 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica. Após avaliação histológica dos músculos dos 3 grupos, observou-se que no primeiro e segundo grupos havia sinais claros de atrofia nos cortes musculares (reveladas por infiltrados de tecido gorduroso, rarefação celular e presença de linfócitos). No grupo que recebeu LASER diariamente (grupo 3), observou-se nas fibras nervosas, aspecto morfológico tipicamente normal com presença de fibras mielinizadas de grande e médio diâmetro, fibroblastos presentes e aumento de vasos sanguíneos. Tais reações foram melhor observadas a partir do 14º dia de experimentação.

Na tentativa de explicar os efeitos do laser de baixa potência no processo inflamatório e, conseqüentemente, na cicatrização de feridas, inúmeros trabalhos foram realizados (MANTENFEL; BAKEEVA; KARU, 1997). Estes mesmos estudos, focalizam também os mecanismos da interação do LASER com os tecidos, que estão envolvidos neste processo. No entanto, Baxter (2003) alerta que muitos dos resultados encontrados até agora, são mal controlados com casuística relativamente pequena, e com resultados contraditórios.

A utilização da laserterapia no tratamento de feridas humanas popularizou-se a partir da década de 60 e início da década de 70, com os trabalhos de experimentação animal e clínica de Mester e Mester, que utilizando radiação de laser de rubi e HeNe, obtiveram resultados na aceleração da regeneração das feridas (BAXTER, 2003).

Dentro desse contexto, vale salientar a repercussão de um estudo publicado por Mester et al., 1974 (apud Mester; Mester; Mester, 1985), onde foram estudados 970 voluntários, portadores de úlceras persistentes, sem respostas ao tratamento convencional, advindas de variadas etiologias. O laser de He-Ne foi aplicado na dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, duas vezes por semana. O processo de cicatrização ocorreu em torno da 12ª a 16ª semana, com cura total em 875 dos voluntários, melhora em 160 e apenas 85 não responderam ao tratamento.

Autores como Sandoval-Ortiz (2001) e Karu (1998) acreditam que o efeito do laser sobre a inflamação ocorre, inicialmente, em função da inibição da liberação de fatores quimiotáxicos, interferindo sobre os efeitos dos mediadores químicos induzidos na inflamação, alterando a permeabilidade vascular com conseqüente diminuição da quantidade de exsudato.

Albertini et al. (2002) estudaram o efeito de várias densidades de energia laser (AsGaAl) em um modelo inflamatório agudo. O efeito da radiação LASER foi avaliado a partir da análise do edema nas patas de ratos. O instrumento utilizado para mensurar o volume de edema foi um hidroplesitimômetro, com o qual o edema foi medido antes e após a indução. Os resultados demonstraram entre outros aspectos, que a densidade de energia do laser em um  $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $2,5\text{ J}/\text{cm}^2$  mostraram-se mais eficiente na redução de edema.

O trabalho de Honmura et al. (1992) reafirma o efeito do laser sobre a permeabilidade vascular e diminuição do exsudato inflamatório. Este estudo foi realizado em um modelo experimental inflamatório utilizando radiação com Laser de AsGaAl com 10 mW de potência e de intensidade igual a  $31,8\text{ mW}/\text{cm}^2$ . Os resultados demonstraram um efeito de diminuição da produção de exsudato em grupo tratado imediatamente após a lesão e grupo tratado 3 h após a lesão.

Os níveis de prostaglandinas, secretados no processo inflamatório, foram avaliados por Enwemeka et al. (1990), que evidenciaram efeito fotoestimulador do laser na sua modulação.

Parizotto (1998) estudou os efeitos do laser de He-Ne no processo de reparo tecidual de tendões de ratos, no qual evidenciou-se que uma maior produção de colágeno ocorria com dose de  $5\text{ J}/\text{cm}^2$ . Entretanto, doses de  $50\text{ J}/\text{cm}^2$  e  $0,5\text{ J}/\text{cm}^2$  também apresentaram respostas favoráveis.

Bisht et al. (1999) pesquisaram o efeito do laser de He-Ne (5 mW) no processo de reparação de pele, bem como o aumento da força de tensão do tecido cicatricial. A análise histológica mostrou-se uma epitelização mais rápida e maior habilidade em resistir à ruptura contra uma tensão no grupo tratado. O estudo sugere que a maior força de tensão encontrada deve-se ao aumento da reação fibroblástica, infiltração leucocitária e angiogênese.

Mendez (2002) estudou a influência da dose e do comprimento de onda do LASER no reparo tecidual em feridas cutâneas em ratos. Em seu estudo, foram utilizados os comprimentos de 830nm e 685nm isolados e em conjunto, com doses de 20 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup> e os animais foram divididos em sete grupos. Após a irradiação laser, foram sacrificados de forma seriada no período de 3, 5 e 7 dias. Os resultados obtidos, evidenciaram um aumento significativo na produção de colágeno, quando comparados com o grupo controle. Os grupos trabalhando com os comprimentos de onda de 830nm e 685nm com doses de 20 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup> e o de 830nm com 50 J/cm<sup>2</sup> apresentaram o melhor resultado no final do período experimental.

Em estudo experimental realizado por Pugliese et al. (2003), 72 ratos Wistar, sofreram sofrimento dorsal e em seguida, aplicação pontual de radiação laser de baixa potência do tipo GaAsAl com diferentes densidades de energia. Os animais foram sacrificados com 24, 48 e 72 h, como também com 5, 7 e 14 dias. Procedeu-se à análise das secções teciduais coradas por hematoxilina-eosina, sítius vermelho e orceína. Para a realização do estudo dos miofibroblastos, os anticorpos anti-vimentina, anti-actina-alfa de músculo liso e anti-desmina foram usados pela técnica de imunohistoquímica. As características ultraestruturais dessas células foram estudadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se que nos grupos submetidos à laserterapia, houve maior redução de edema e infiltrado inflamatório, assim como desgranulação de mastócitos. Com a evolução da cicatrização, os níveis de colágeno demonstraram-se mais pronunciados nos grupos tratados com laser. Com relação às fibras elásticas, não se constatou diferenças entre os grupos. A marcação imunohistoquímica de miofibroblastos expressando o fenótipo desmina/actina alfa de músculo liso foi mais evidente no 3º, 5º e 7º dias do período pós-operatório, e foi superior nos grupos tratados. Os achados ultra estruturais revelam a presença de células com filamentos intracitoplasmáticos, corpos densos abaixo da membrana plasmática, rico retículo endoplasmático rugoso e núcleo chanfrado. O grupo tratado com 4 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia apresentou resultados mais favoráveis, comparativamente ao de 8J/cm<sup>2</sup>. O laser contribuiu para a redução do edema pós-operatório, e proporcionou um aumento do

colágeno, em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, induziu uma maior expressão de miofibroblastos no leito do ferimento.

O estudo de Corazza (2005) comparou os efeitos angiogênicos da radiação laser coerente e sem colimação, com a luz sem coerência e sem colimação (LED), em feridas induzidas em ratos, com diferentes potências. O modelo experimental consistia da indução de uma ferida circular no quadríceps dos animais. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: LASER (660 nm) e LED (635 nm), sendo que as doses foram ajustadas a 5 J/cm<sup>2</sup> e 20 J/cm<sup>2</sup>, além do controle. Após 6 h da indução das feridas, os grupos tratados recebiam aplicação pontual de laser, com repetição do procedimento a cada 24 h. A angiogênese foi analisada por meio da histomorfometria (H.E), e a contração das feridas pelo *software* de planimetria. Os resultados foram analisados no 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-lesão. Os achados histológicos no 3º dia foram determinantes para observação de uma significativa proliferação de vasos sanguíneos dos grupos tratados em relação ao controle. No 21º dia, os grupos tratados com potência de 5 J/cm<sup>2</sup> apresentavam valores estatísticos com maior eficiência na angiogênese quando comparados com o grupo laser a 20 J/cm<sup>2</sup>, sugerindo que fluências elevadas podem induzir um processo do tipo saturação.

O estudo realizado por Baldan (2005) teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes doses de irradiação com laser de diodo semiconductor de baixa potência, sobre a viabilidade de retalhos cutâneos. Neste experimento foi utilizado o LASER vermelho de baixa potência, com 670 nm de comprimento de onda em 40 animais, divididos em 4 grupos, aleatoriamente, um grupo foi utilizado como controle e os outros 3 grupos receberam radiação laser com doses de 2,14; 5,36 e 20,35 J/cm<sup>2</sup>. Foi analisada a área de necrose, sendo que os autores observaram um melhor efeito com dose de 20,35 J/cm<sup>2</sup> em comparação às doses de 2,14 e 5,36 J/cm<sup>2</sup>.



## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo caracterizou-se como uma pesquisa experimental provocada, randomizada, do tipo simples cego, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Evangélica do Paraná, sob o registro nº 2109/05 no dia 21 de setembro de 2005 (anexo 1). Os procedimentos experimentais foram realizados nos laboratórios da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba-PR. O estudo anátomo-patológico foi desenvolvido no laboratório da disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

#### **3.1 GRUPO EXPERIMENTAL**

A amostra foi composta por 45 ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), com idade de cem a cento e trinta dias, pesando entre 250-300 g, procedentes do biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 h, ração sólida comercial e água *ad libitum* durante todo o período experimental, totalizando 15 dias (ANDERSEN, 2004).

Os animais foram pesados e randomicamente divididos em três grupos iguais de 15 animais e, então, identificados por um número e pelos grupos LA (LASER), e C.E (corrente elétrica) e D.C.F (diclofenaco de sódio- controle).

#### **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Todos os procedimentos foram realizados respeitando-se os parâmetros da Lei Federal n. 6.638 e do documento normativo do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Utilizou-se anestésico Thiopental sódio na dose de 15mg/kg de peso do animal e, ainda, 0,1ml de ketamina com concentração de 50mg/ml para cada animal,

ambos aplicados através da via intraperitoneal. Após anestésiar o animal, realizou-se tricotomia dorsal, seguindo-se, então, a anti-sepsia com povidine-iodine (PVPI). Uma incisão de 6 cm de comprimento foi marcada e confirmada com ajuda de um paquímetro (Figura 5A). Foi utilizado um bisturi de lâmina 20 e realizada uma lesão superficial na pele do dorso dos animais. Todas as incisões foram realizadas por uma única pessoa, com o mesmo tipo de lâmina e no mesmo dia, com o objetivo de manutenção da uniformidade da incisão. Os animais foram novamente colocados individualmente em gaiolas também identificadas.

Após 24 h da lesão iniciaram-se os procedimentos de aplicação. No grupo LA foi aplicado laser He-Ne (VR.KC 650, KROMAM<sup>®</sup>) com comprimento de onda em 632,28 nm, emissão contínua de 5mW, dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, por meio da técnica de aplicação pontual, em toda a extensão da cicatriz, 30 s por ponto (Figura 5B).

O grupo C.E recebeu estimulação elétrica (Neurodyn Estetic, IBRAMED<sup>®</sup>), com uma corrente elétrica pulsada bifásica, que apresentou dois padrões: o primeiro, pulso quadrado com 24 s de duração e inversão de polaridade a cada 3 s (figura 6), e o segundo, com duração de 16 s, apresentando pulsos retangulares, apesar de existir simetria de carga. A morfologia do estímulo pode ser verificada no resultado gráfico do ensaio de desempenho do estimulador elétrico (Anexo 4). A intensidade utilizada foi de 100µA, por meio da técnica pontual em toda a extensão da cicatriz, 30 s por ponto (Figura 5C).

O grupo D.C.F recebeu injeção intraperitoneal de diclofenaco de sódio, na concentração de 3 mg/kg da massa corporal. Os animais foram tratados diariamente, durante um período de 15 dias. A retirada das amostras foi realizada no 1º, 2º, 5º, 7º e 15º dias pós-cirurgia. Para este procedimento, os animais receberam novamente a anestesia intraperitoneal, e as amostras de pele com 0,5 x 0,5 cm foram cirurgicamente retiradas (Figura 5D). A ordem de retirada das amostras seguiu um padrão de distância (caudal – cefálica – central - intermediária). O armazenamento foi feito frascos com solução de formaldeído a 10%. Cada frasco foi identificado com um código numérico do animal e a que grupo pertencia (LA, D.C.F e C.E). Posteriormente as amostras foram encaminhadas para confecção das lâminas e a realização da análise histológica.

### 3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cada fragmento de pele, incluindo a margem do ferimento e o tecido subcutâneo foi fixado em 10% de formalina (Reagen, RJ-Br) e embebido em parafina (Nuclear, CAQ, SP, Brasil). Os blocos foram orientados de forma ao obter cortes perpendiculares, com espessuras de, de 0,4  $\mu\text{m}$  utilizando um micrótomo (Olympus cut 4060, América. Inc.). As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina e *Picrosirius*. As lâminas foram identificadas, sendo que posteriormente os dados de identificação eram ocultados para a análise dos elementos do tecido (células e vasos), configurando um estudo simples cego. Os segmentos histológicos corados com Hematoxilina-eosina (HE) permitiram avaliar de forma semi quantitativa os vasos neoformados e o número de células do tecido de granulação na pele dos animais dos três grupos. A identificação das células e vasos foi feita baseada em Junqueira e Carneiro (1995).

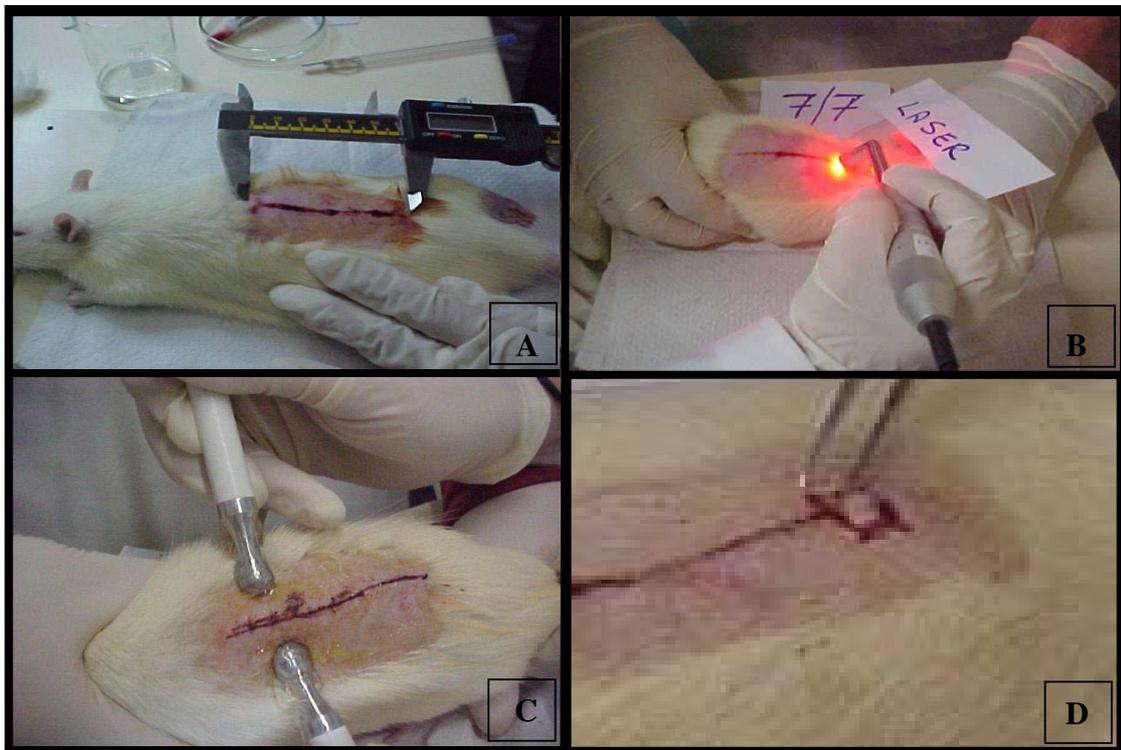


Figura 5 – Procedimentos metodológicos com os grupos analisados Em (A) Incisão marcada e confirmada com paquímetro; em (B) aplicação do LASER; em (C) aplicação da estimulação elétrica e em (D) Retirada das amostras.

Para a avaliação da área e densidade de colágeno, os cortes histológicos foram corados com *Picrosirius*.

As lâminas coradas com HE foram analisadas em um microscópio óptico BX50 Modelo L 2000 A (03 Bioval) em aumento de 200 vezes e, em seguida, fotografadas com ampliação de 100 vezes. O procedimento de leitura seguia a seguinte padronização: Colocação da lâmina, escolha aleatória de um campo, centralização da cicatriz, contagem do número de células, to de leitura Aquelas coradas com *Picrosirius* foram analisadas com o auxílio de um microscópio BX50 com aumento de 200 vezes acoplado à uma câmara de vídeo Sony, cuja imagem era enviada a um computador tipo Pentium, utilizando-se um aplicativo Image Pro-Plus.

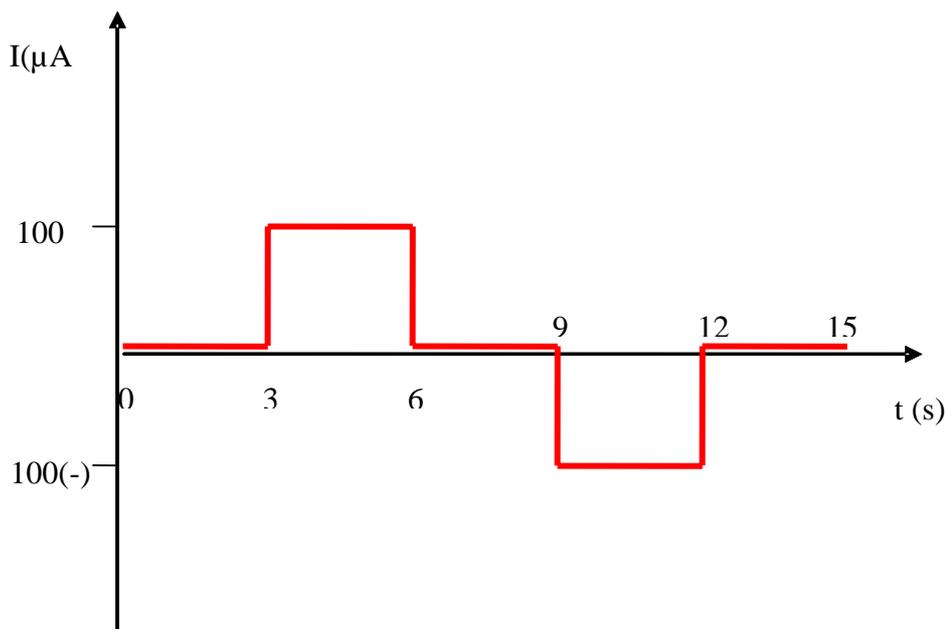


Figura 6 - Corrente elétrica pulsada bifásica quadrada de 100  $\mu\text{A}$  com inversão de polaridade a cada 3s.

A coloração pelo método do *Picrosirius* faz com que grande quantidade de moléculas do Sirius Red, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas à luz polarizada. Assim, o método da coloração com *Picrosirius* associado à microscopia de polarização é um

método histoquímico específico para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno (JUNQUEIRA, BIGNOLAS; BRENTANI, 1999).

### **3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA**

Foram analisadas a quantidade de células do tecido de granulação e a neoformação de vasos, por serem elementos que permitem avaliar a evolução do processo de reparo tecidual. As lâminas foram focalizadas e a cicatriz centralizada no campo. Em seguida processava-se a contagem de células e de vasos. A codificação usada, para contagem, foi baseada em Pugliese et al. (2003) e Wietzikoski (2005), onde "pouco" foi considerado um número igual ou menor que 10 vasos e células do tecido de granulação; e "muito", como um número maior do que 10 vasos ou 10 células do tecido de granulação em um campo escolhido aleatoriamente.

### **3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUANTITATIVA MORFOMETRICA**

A análise morfométrica foi realizada com lente polarizada para leitura do depósito de colágeno, feita através das cores do tecido. Foram analisadas a densidade dos colágenos tipo I e III, seguindo orientações contidas no manual para análise de imagens do Image-Pro Plus.

O n dos grupos experimentais (LA, C.E e D.C.F) variou por dia de tratamento ( $3^0$ ,  $5^0$  e  $7^0$ ). Esta variação pode ser explicada pela necessidade de se padronizar o tamanho das amostras. Algumas lâminas, em função da falta de um padrão mínimo de tamanho, foram excluídas. Este critério limitou o viés ou erro de observação. Segundo Mandarin-Lacerda (1991), uma preocupação freqüente do pesquisador que utiliza a morfometria é a possibilidade de ocorrência de erros de observação que só podem ser excluídos com a padronização do tamanho das amostras.

Após a focalização da lâmina no microscópio, centralizou-se a cicatriz e foram selecionados três campos aleatórios.

O aparelho foi ajustado com objetiva de 20 vezes. A imagem foi selecionada, capturada e congelada em arquivo específico, com especificação de cada animal e

grupo a que pertencia (LA, D.C.F, C.E). A calibração do sistema orientou-se pela densidade óptica de pontos (*pixels*) que formavam as imagens, escolhendo-se o limiar de melhor resolução. O sistema se encontra ajustado dentro dos limites de zero a 2, onde o zero determina a passagem total de luz e 2 a ausência total de luz. Quanto maior for a densidade de colágeno mais próximo de 2 e quanto menor a densidade de colágeno, mais próximo de zero.

As imagens foram, uma a uma, submetidas a uma seleção de cores, sob luz polarizada. Inicialmente, foram selecionadas, manualmente, as cores vermelha e alaranjada, por serem as cores que tingem o colágeno tipo I polarizado (colágeno maduro), formado por fibras espessas e fortemente birrefringente, obtendo-se a densidade total de colágeno tipo I nos três campos analisados. Repetiu-se o processo, selecionando-se o amarelo e o verde, por serem as cores que tingem o colágeno tipo III polarizado (colágeno imaturo), formado por fibras mais finas e fracamente birrefringentes.

A observação de que colágenos dos tipos I e III mostram diferentes cores e intensidades de birrefringência em um mesmo corte histológico, conforme descrito por Junqueira et al., 1999, pode ser explicada pelo fato de que esses diferentes tipos de colágenos apresentam padrões distintos de agregação física. Assim, o colágeno do tipo I forma fibras grossas (fibras colágenas), compostas por fibrilas grossas densamente agrupadas e, conseqüentemente, apresenta intensa birrefringência com coloração avermelhada. O colágeno do tipo III forma fibras finas (fibras reticulares), compostas por fibrilas finas, frouxamente dispostas mostrando fraca birrefringência de coloração amarelo e verde. A utilização desse método permite a identificação diferenciada das fibras de colágeno.

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Na primeira etapa do trabalho a análise estatística direcionou-se ao estudo das células do tecido de granulação e dos novos vasos formados. Verificando-se a ocorrência de muitas e poucas células do tecido de granulação e dos novos vasos formados.

Foram organizadas tabelas de freqüências agrupando-as por cada dia de tratamento ao longo do período (1º ao 15º dias) e realizada a comparação intragrupo. Por meio da aplicação do teste Exato de Fisher investigou-se, em cada grupo de tratamento (LASER, C.E e D.C.F) a existência de diferença significativa entre os elementos nos dias de tratamento.

Outro aspecto analisado foi a comparação entre o número de células e vasos, em cada dia, para os três grupos de tratamento (comparação intergrupos)

Na segunda etapa do trabalho para análise do colágeno aplicou-se o teste Kruskal-Wallis para a densidade de colágeno tipo I (maturo) e o tipo III (imaturo), com nível de significância adotado de 5%. Após a confecção das lâminas, foram selecionados três campos em cada uma para a análise do colágeno, calculou-se a média, o desvio padrão e a mediana.

O objetivo da análise foi comparar a densidade de colágeno nos grupos submetidos aos 3 tratamentos (no 3º, 7º e 15º dia pós-lesão), assim como a comparação, especificamente, da quantidade de colágeno tipo III (imaturo) dentro de cada grupo entre, o 3º e 15º dias.

Na comparação da densidade de colágeno entre o 3º e o 15º dia no mesmo grupo, foi usado o teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Para todos os testes, valores de  $p < 0,05$  indicam significância estatística. Em todas as análises, o software utilizado foi o Statistic 5.1.



## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

Neste capítulo, apresentam-se os registros gráficos dos resultados. Os dados iniciais são referentes às análises de células do tecido de granulação e neovasos. Posteriormente, organizou-se os resultados obtidos com a morfometria: densidade de colágeno tipo III e tipo I.

#### 4.1 CÉLULAS DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

Na gráfico 1 estão expressos valores percentuais referentes ao número das lâminas com “muitas” células do tecido de granulação, por dia de experimento. A comparação foi realizada entre os grupos tratados com: LASER e diclofenaco de sódio, corrente elétrica e LASER e corrente elétrica e diclofenaco de sódio. A tabela contendo valores numéricos detalhados, incluindo o resultado da aplicação do teste exato de Fisher encontra-se no apêndice 1.

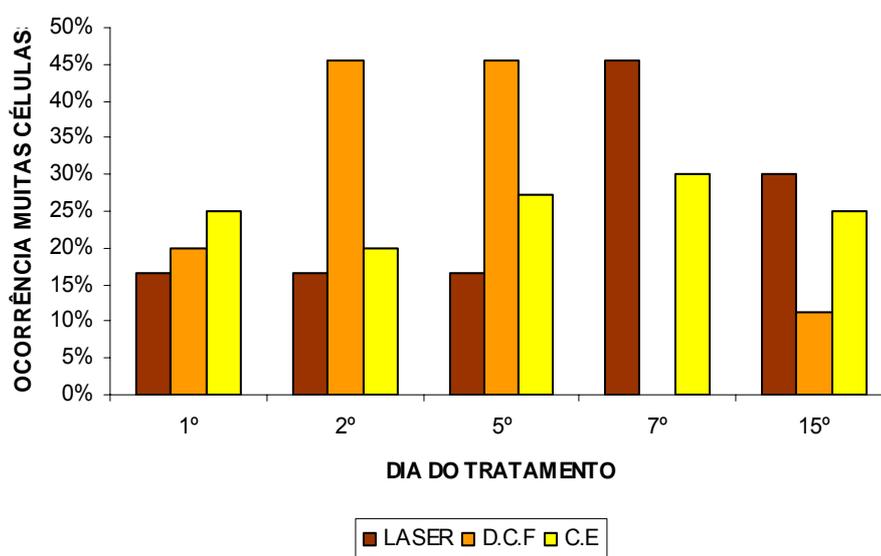


Gráfico-1 Comparação entre os tratamentos, LASER (LA), Diclofenaco de sódio (D.C.F) e Corrente elétrica (C.E) relacionando a ocorrência de “muitas células” da granulosa, por grupo de tratamento, em cada dia do experimento.

Ao longo do período de execução do protocolo experimental (comparação intra-grupo), observou-se um aumento significativo do número de células do tecido de granulação no grupo tratado com LASER (LA) entre o 2º e o 7º dia de aplicação ( $p=0,0325$ ). Nos grupos tratados com diclofenaco de sódio (D.C.F) e corrente elétrica (C.E), não se encontrou variação significativa para as células do tecido de granulação.

Na comparação intergrupos, constatou-se uma diferença significativa no 7º dia pós-lesão entre o grupo tratado com LA e o grupo tratado com D.C.F ( $p=0,0379$ ): nenhuma das lâminas do grupo tratado com D.C.F apresentaram mais que 10 células do tecido de granulação; portanto, a porcentagem de muitas células é zero, justificando a ausência da coluna do D.C.F no 7º dia (gráfico 2).

As figuras 7 e 8 são fotos dos resultados das análises microscópicas das lâminas com coloração de Hematoxilina-eosina (HE), no grupo tratado, respectivamente, com LASER e Diclofenaco de sódio. As imagens foram utilizadas para a demonstração do número de células do tecido de granulação, no 7º dia de pós-operatório. Pode-se observar um número de células do tecido de granulação mais intenso na lâmina referente ao animal tratado com LASER, em relação ao animal tratado com estimulação elétrica e DCF. As flechas indicativas sinalizam as células do tecido de granulação.

## **4.2 VASOS NEOFORMADOS**

No gráfico 2, representam-se os valores referentes ao número das lâminas com “muitos” vasos, por dia do experimento. A comparação foi realizada entre o grupo tratado com LASER e DCF, LASER e corrente elétrica e DCF e corrente elétrica. A tabela contendo valores numéricos detalhados, incluindo o resultado da aplicação do teste exato de Fisher encontra-se no apêndice 1.

Ao longo do período de tratamento, constatou-se um aumento significativo do número de vasos no grupo tratado com laser entre o 1º e o 7º dia de aplicação ( $p=0,030$ ). No grupo tratado com DCF, houve uma variação significativa do número de vasos entre o 5º e 15º ( $p=0,037$ ) e entre o 2º e 7º ( $p=0,012$ ) dias pós-lesão. No grupo em que foi aplicada a corrente elétrica, verificou-se uma diferença significativa com relação ao número de vasos entre o 5º e o 15º dias de tratamento ( $p=0,032$ ),

sendo que no 15º o número de vasos é menor. Também no 7º dia de aplicação, verifica-se uma diferença significativa entre o grupo de animais tratados com estimulação elétrica e o que recebeu doses diárias de DCF ( $p=0,0325$ ) e do grupo tratado com laser em relação ao controle (DCF) ( $p= 0,0023$ ). Para os animais que receberam aplicação da estimulação elétrica, o número de vasos foi maior (gráfico 2). No 7º e 15º dias, constata-se a ausência das barras referente aos grupos tratados com DCF e estimulação elétrica, respectivamente. Este dado representa a ausência de muitos vasos nas amostras analisadas.

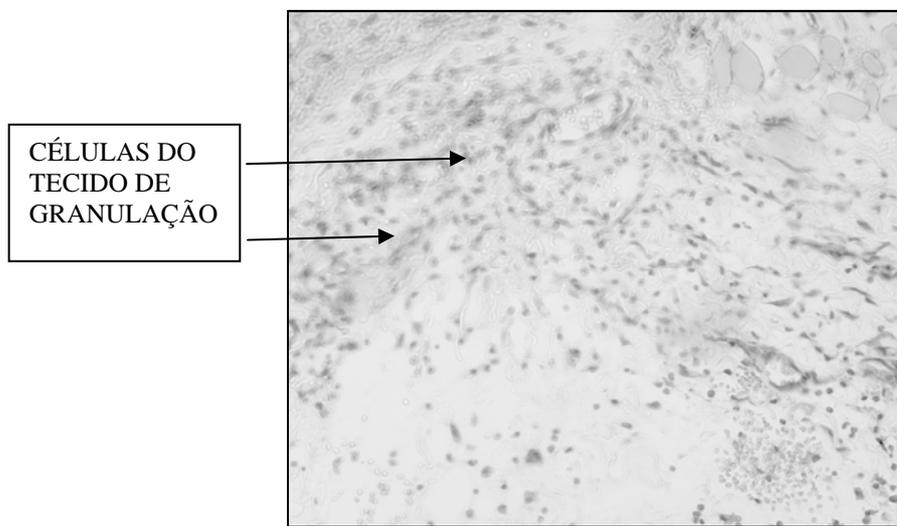


Figura 7 - Células do tecido de granulação (muitas) no 7º dia – LASER

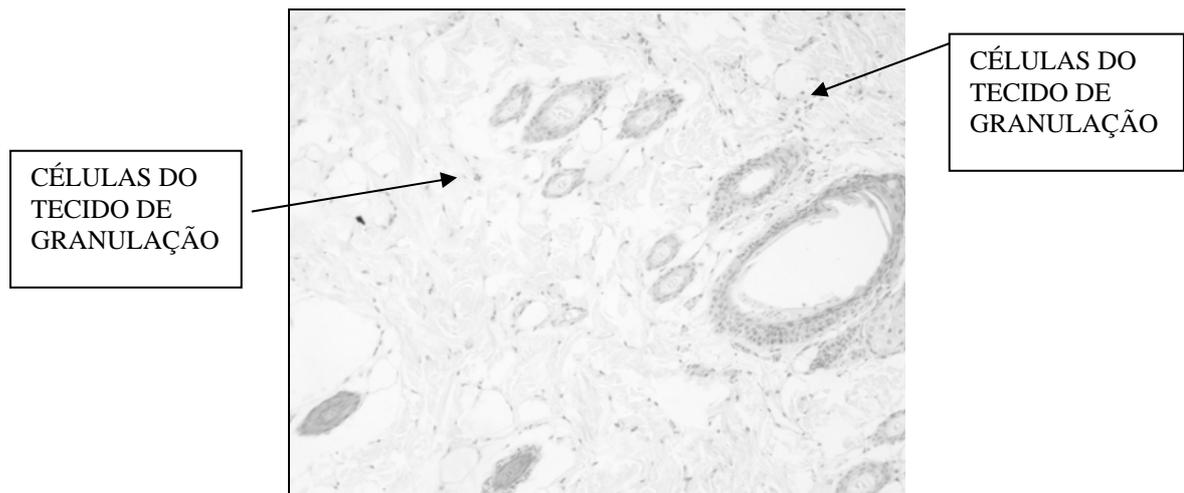


Figura 8 - Células do tecido de granulação (muitas) no 7º dia – Estimulação elétrica.

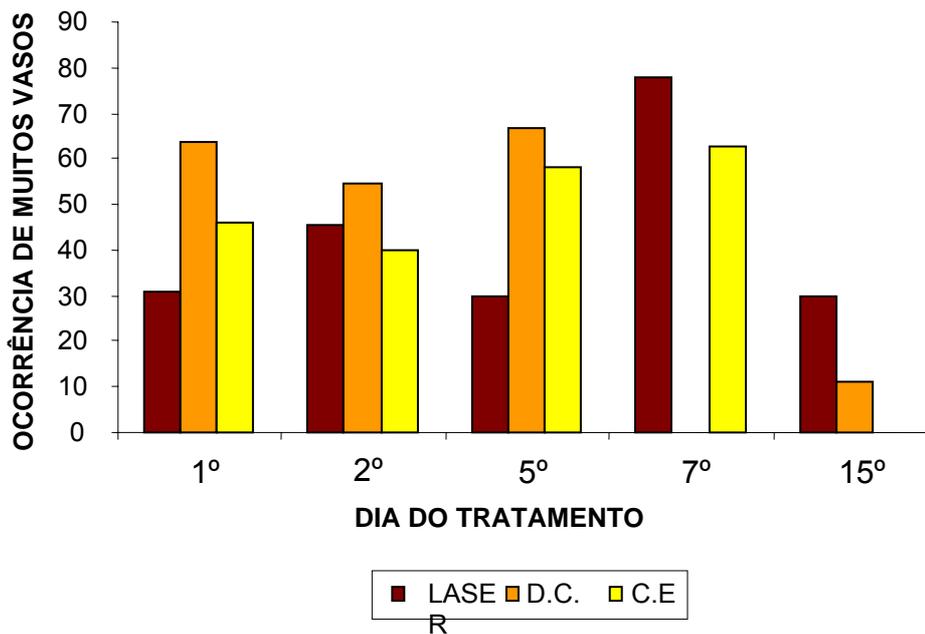


Gráfico 2 - Comparação entre os tratamentos LASER (LA), Diclofenaco de sódio (D.C.F) e Corrente elétrica (C.E) relacionando a ocorrência de “muitos” vasos neoformados, por grupo de tratamento, em cada dia de tratamento.

As figuras 9 e 10 decorrem das análises microscópicas com coloração com Hematoxilina-eosina (HE), no grupo tratado, respectivamente, com LASER e estimulação elétrica. As imagens foram utilizadas para a demonstração do número de vasos, no 7º dia de pós-operatório, no grupo tratado com LASER e no grupo tratado com corrente elétrica.

O gráfico 3 apresenta a ocorrência da porcentagem de “muitos” vasos no 7º dia de tratamento, com uma diferença significativa entre o grupo de animais tratados com corrente elétrica e o que recebeu doses diárias de diclofenaco de sódio ( $p=0,0325$ ). Sendo que, os animais que receberam aplicação estimulação elétrica número de vasos foi maior.

No grupo tratado com LASER se observa o mesmo comportamento, com um número de vasos significativamente maior em relação ao controle (D.C.F), ( $p=0,0023$ ). No grupo tratado com D.C.F, a coluna não aparece em função de não haver mais de 10 vasos em nenhuma das lâminas analisadas.

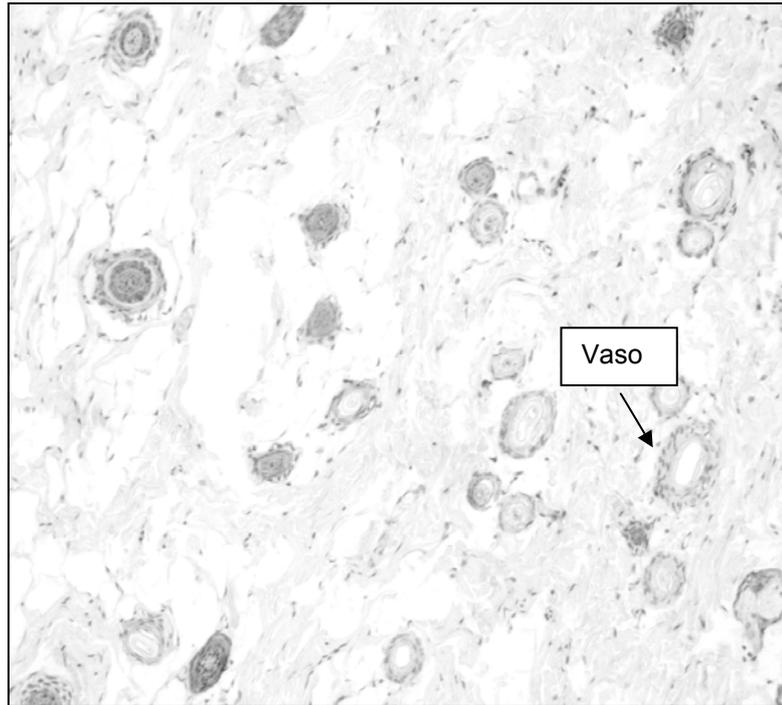


Figura 9 - Formação de vasos no 7º dia – LASER.



Figura 10 - Formação de vasos no 7º dia - corrente elétrica.

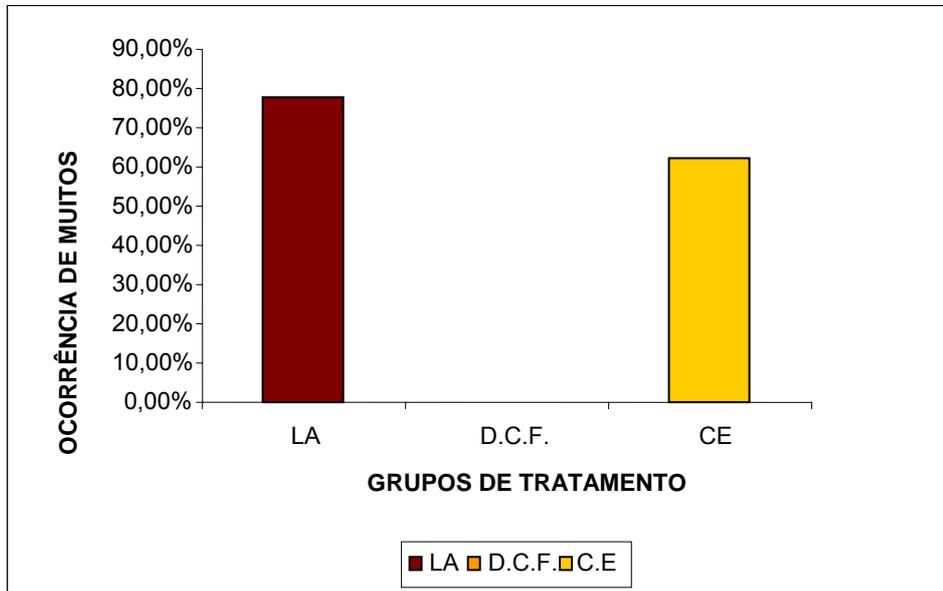


Gráfico 3- Comparação do percentual de ocorrência de muitos vasos entre os tratamentos LASER (LA), Diclofenaco de sódio (DCF) e Corrente elétrica (C.E) no 7º dia de tratamento.

#### 4.3 DENSIDADE DE COLÁGENO TIPO I E III

Para cada uma das variáveis, em cada momento da avaliação, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 3 grupos de estudo versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. No gráfico 4, estão representados os resultados comparativos entre os grupos de tratamento para a densidade de colágeno tipo III, quantificada em cada um dos três campos de análise das lâminas, no 3º, 7º e 15º dia de pós-operatório. Os valores numéricos detalhados com a média, mediana e os valores de p do teste estatísticos encontram-se na tabela 3 do apêndice 1.

As figuras 11, 12 e 13 são resultados da análise microscópica com as lâminas com coloração Sirius-red e polarização, respectivamente, do grupo corrente elétrica (C.E), LASER (LA) e diclofenaco de sódio (D.C.F), no 15º dia de pós-operatório, utilizando-se técnica de polarização. Nas figuras 11 e 12 (grupo C.E e grupo LA) observa-se intensa tonalidade verde/amarelada, coloração específica do colágeno tipo III (jovem). Na figura 13, grupo tratado com D.C.F a tonalidade avermelhada é mais intensa, coloração mais específica para o colágeno tipo I (colágeno maduro).

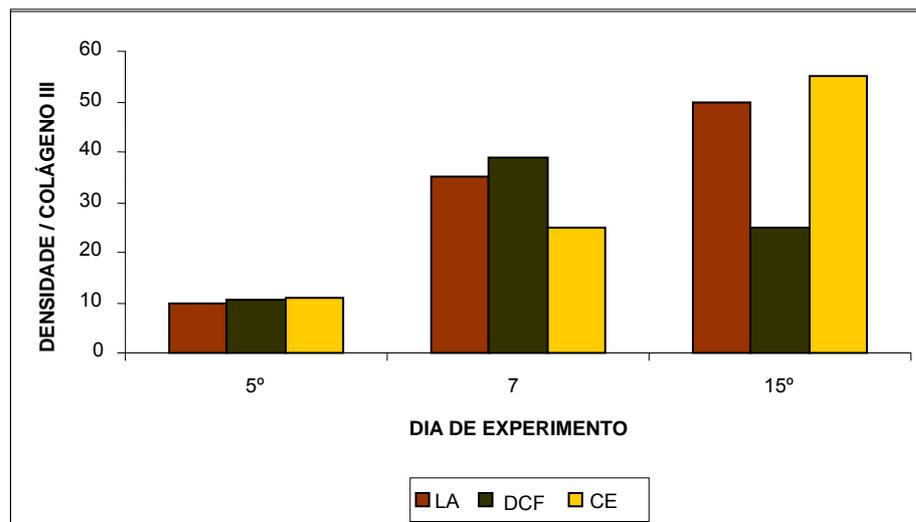


Gráfico 4 - Comparação da densidade de colágeno tipo III no 3º, 5º e 15ª dia, em cada um dos grupos de tratamento (medianas)

No gráfico 5 estão representados os resultados comparativos entre os grupos de tratamento para a densidade de colágeno tipo I, quantificada em cada um dos três campos de análise das lâminas, no 3º, 7º e 15º dia de pós-operatório. Os valores numéricos detalhados com a média, mediana e os valores de p do teste estatísticos encontram-se na tabela 4 do apêndice 1.

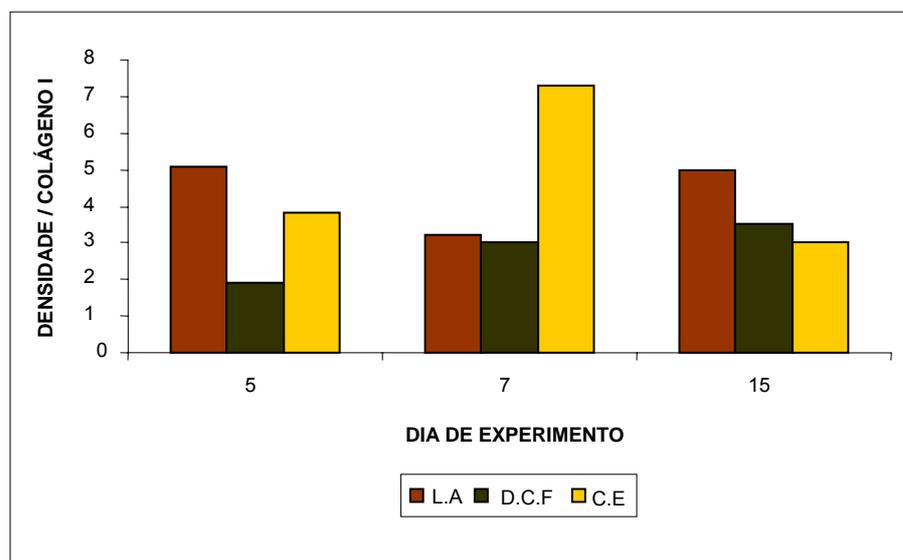


Gráfico 5 - Comparação entre os tratamentos LASER (LA), diclofenaco de sódio (D.C.F) e corrente elétrica (C.E), relacionando a densidade de colágeno tipo I no 5º, 7º e 15º dia em cada um dos grupos de tratamento. (medianas)

As figuras 14, 15 e 16 são resultados da análise microscópica com coloração Sirius-red e técnica de polarização, respectivamente, do grupo: corrente elétrica (C.E), LASER (LA) e diclofenaco de sódio (D.C.F), no 15º dia de pós-operatório. Observa-se coloração em tonalidade mais avermelhada, específica do colágeno tipo I (colágeno maduro), em comparação às lâminas com densidade mais expressiva de colágeno tipo III (colágeno jovem) que tingiram-se de tonalidade verde/amarelada (figuras 11e12), nos grupos tratados com LASER e corrente elétrica.



Figura 11 - Morfometria polarizada mostrando fibras colágenas tipo III, grupo CE no 15º dia - Concentração de tonalidades verde/amarelada



Figura 12- Morfometria polarizada mostrando fibras colágenas tipo III, grupo LA no 15º dia - Concentração de tonalidades verde/amarelada.



Figura 13- Morfometria polarizada mostrando fibras colágenas tipo III grupo DCF no 15º dia - Concentração de tonalidade avermelhada.

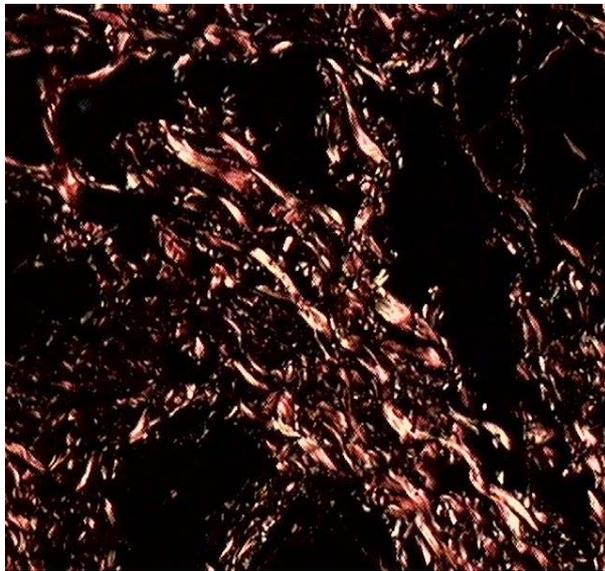


Figura 14 – Morfometria polarizada mostrando concentração de fibras colágenas tipo I no grupo CE no 15º dia - Tonalidade avermelhada.



Figura 15 – Morfometria polarizada mostrando concentração de fibras colágenas tipo I no grupo LA no 15º dia - Tonalidade avermelhada.



Figura 16 - Morfometria polarizada mostrando concentração de fibras colágenas tipo I no grupo DCF no 15º dia- Tonalidade avermelhada.

## **CAPÍTULO 5**

### **DISCUSSÃO**

#### **5.1 ASPECTOS GERAIS**

Dentre os recursos físicos mais recentes para o tratamento de feridas destacam-se a indicação do LASER e da estimulação elétrica como os mais comumente utilizados para favorecer o processo de reparo da pele.

O processo de recuperação de uma ferida é quantificado pela medida de aproximação das margens da pele. Com relação a este aspecto, na revisão de literatura, encontram-se resultados positivos tanto para o LASER (MESTER et al., 1974; BISHT et al., 1999; CARVALHO et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; WIETZILKOSKI et al., 2003; BUERGER, 2004) quanto para estimulação elétrica (DUNN, 1998; BAKER, 1997; CHENG et al., 1982; CHU et al., 1996; SONENEWEND et al., 2006).

Com relação à estimulação elétrica, o panorama científico parece bastante conflitante, pode-se evidenciar que as publicações não relatam os parâmetros exatos da estimulação, o número limitado de ensaios controlados dificultam a quantificação e comparação dos efeitos da estimulação elétrica na reparação da pele (WATSON, 2003). Os dados são controversos no que diz respeito à intensidade, forma de onda, tempo de aplicação, posicionamento dos eletrodos. Apesar desta falta de padronização nos resultados de ensaios clínicos, os efeitos benéficos predominam e somente a minoria de estudos mostra resultados nulos ou negativos.

O mecanismo de ação da estimulação elétrica baseia-se na teoria da bioeletricidade, defendida por autores como: Barcker, Jaffe e Vanable (1982); Becker (1974,1982); Weis, Kisner e Eaglsteir (2003). Estes autores evidenciaram que a bioeletricidade endógena é responsável pela deflagração e direcionamento do processo de reparo. Defendem, ainda, que os campos elétricos exógenos (estimulação elétrica) teriam ação sobre o desencadeamento dos eventos químicos, celulares e vasculares relacionados às fases da cicatrização.

Muitos investigadores têm evidenciado que as células envolvidas nas lesões de pele migram em direção ao ânodo ou cátodo (galvanotaxia) dependendo do tipo de célula (EBERHARDT, 1986; BOURGUIGNON et al. 1989; DUNN, 1998; KLOTH, 2005). Dados contraditórios são relatados por Godbout e Frenette (2006), num estudo em que não observaram o aumento da velocidade da taxa de migração do fibroblasto por estímulos elétricos, em um modelo *in vitro*. A investigação realizada por Dunn (1988) demonstrou que o uso de corrente direta com intensidades entre 20 a 100  $\mu\text{A}$ , foi capaz de aumentar o número de fibroblasto para o cátodo. Kloth (2005) destaca a galvanotaxia como um efeito fisiológico, evidenciado em 13 estudos realizados *in vitro*.

Os achados de Godbout e Frenette 2006 podem ser discutidos, em função da falta de similaridade biológica do modelo *in vitro* utilizado. A cicatrização é uma seqüência orquestrada de eventos celulares e bioquímicos que prosseguem por semanas. O estudo analisou o comportamento da migração celular nas primeiras 8 h, ignorando, também, o fato que a estimulação elétrica é mais apropriada para reverter o potencial elétrico da lesão, em torno do 4º dia de reação inflamatória (WEIS, 2003).

Outro efeito atribuído à estimulação elétrica ocorreria no processo de regeneração dos tecidos através do efeito bactericida. As mudanças de pH, liberação de íons de eletrodos de prata e o aumento da fagocitose teriam efeito no controle da infecção (FALCONE e SPADARO, 1986; UEZENO, 1998; ROWLEY, MACKENNA; WOLCOTT, 1974; SPADARO, CHASE; WEBSTER, 1986). Dado contraditório observa-se no estudo de Dueland et al. (2003), que relata um efeito nulo no processo de cicatrização, além da constatação de uma infecção por *Proteus* que atingiu 80% do grupo tratado com estimulação elétrica. O modelo experimental utilizado nesta pesquisa foi desenvolvido em porcos. A dificuldade em manter estes animais em ambiente asséptico pode justificar este resultado negativo.

Os estudos *in vitro* indicam os efeitos da estimulação elétrica a nível celular. Em especial, o estudo de Cheng (1982) mostra a ação da corrente elétrica de baixa intensidade (100 a 500  $\mu\text{A}$ ) na concentração de ATP e na incorporação de aminoácidos nas células da pele de ratos. Esses efeitos podem ser explicados pelas modificações causadas pela estimulação elétrica, nos gradientes da membrana

celular. Este dado é sugestivo para suportar os efeitos, reafirmando os achados de Cheng (1982).

Apesar do LASER de baixa potência ser uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas em reabilitação e demonstrar resultados positivos descritos na literatura, as evidências científicas ainda são limitadas e na maioria das vezes contraditórias, necessitando explicações mais detalhadas para o seu uso clínico.

O tratamento de úlceras crônicas foi a primeira aplicação do laser de baixa intensidade experimentada em humanos, quando se utilizou laser HeNe, em doses de  $4 \text{ J/cm}^2$  (BAXTER, 2003). Devido ao êxito conseguido nesses primeiros estudos, principalmente pela maior velocidade de cicatrização e redução da dor, a modalidade tornou-se popular. Porém, ainda hoje, encontra-se na literatura resultados que não confirmam cientificamente os efeitos benéficos. Acredita-se que a não uniformidade destes resultados, deve-se ao fato de que os efeitos de estimulação com laser de baixa potência dependem de inúmeros fatores como: comprimento de onda, intensidade da luz irradiada, tipo de pulso, tipo e profundidade do tecido irradiado, frequência de tratamento (LOOW; REED, 2001), e das condições funcionais do tecido irradiado (SILVA, 2003; TUNER; HODE, 1999). No Brasil, depara-se com um outro fator, ressaltado no trabalho de Bertolini & Nohama, 2003, que se relaciona com a eficácia terapêutica dos equipamentos para laserterapia fabricados no Brasil no que tange aos baixos níveis de potência apresentados nos equipamentos testados.

Várias teorias vêm sendo estruturadas para explicar as reações fisiológicas e terapêuticas da radiação LASER nos tecidos. A teoria bioestimulante defende que a energia absorvida atua na estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Os efeitos de estimulação ou inibição são dose/dependentes (BAXTER, 2003). Ampliando esta idéia, Karu (1987) defende que a bioestimulação (biomodulação) seria de natureza fotobiológica, os efeitos inibitórios seriam causados por destruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória da mitocôndria, portanto a irradiação de baixa potência resultaria numa modulação do metabolismo celular. A teoria fotoquímica baseia-se no estudo de vários autores, enfocando que a energia eletromagnética é transformada em

fotoquímica por estimulação dos cromóforos (BAXTER, 1997; KARU, 19995; KARU, 1998). Vários elementos vêm sendo propostos como cromóforos, especialmente a citocromo c oxidase, encontrada na cadeia respiratória da mitocôndria. As reações físico/químicas iniciais induzidas pela luz nos cromóforos são seguidas por uma cascata de reações celulares que levam à homeostase celular (KARU, 2000).

## 5.2 DA METODOLOGIA

Nas referências pesquisadas sobre o emprego do LASER e da estimulação elétrica no processo de cicatrização de feridas, pode-se destacar a variabilidade na metodologia utilizada, assim como nos resultados encontrados.

A definição do modelo experimental é fator fundamental para aquisição de resultados factíveis. Em estudos experimentais de cicatrização de pele, o rato é a espécie mais comumente utilizada (CHENG, 1992; PARIZOTTO, 1998; MELO et al., 2001; BUERGER, 2004; ALBERTINI et al., 2002; CORAZZA, 2005; SONEWEND et al., 2006). Porém, alguns pesquisadores empregaram porquinhos Yorkshire (ALVAREZ et al., 1983), porquinhos da Índia (DUNN et al., 1988) e porcos (DUELAND et al., 2003; BY, 1994). A pele do porco é identificada como a que mais se assemelha à pele humana. Porém, apresenta dificuldades com relação à obtenção, manuseio, custos e assepsia. No trabalho realizado por Dueland (2003), utilizando porcos observou-se infecção em 80% do grupo de animais tratado e no controle.

Neste estudo, a opção pela utilização de ratos machos decorreu da facilidade de obtenção e manutenção desses animais e a conseqüente possibilidade de um grupo amostral maior. O gênero macho é justificado pela variação do ciclo hormonal das fêmeas.

Como anestesia, foi utilizada a associação de Ketamina e thiopental. A indicação da associação foi em função do efeito prolongado em animais com metabolismo intenso como é o caso do rato (ANDERSEN, 2004).

A utilização de um grupo controle utilizando a aplicação peritoneal de DCF é justificada pelas exigências com a ética em pesquisa, sendo que a dose aplicada na concentração de 3 mg/kg da massa corporal desencadeia ação analgésica

(ARANCIBIA, 2000). O DCF é um anti-inflamatório não hormonal (AINH) derivado do ácido fenil-acético. Os anti-inflamatórios não hormonais (AINH) são drogas usadas rotineiramente em clínica, freqüentemente empregados no período pós-operatório imediato com finalidades analgésicas e antinflamatórias.

No presente estudo, as amostras de pele foram coletadas no 1º, 2º, 5º, 7º e 15º dia pós-lesão. A escolha desses dias foram definidas baseados na expectativa de se evidenciar os efeitos do tratamento na fase inicial do processo inflamatório, bem como o pico de formação de colágeno tipo I. Segundo Contran, Kumar e Collins (2001), as falhas do reparo que ocorrem nos estágios iniciais, acarretam na acentuação do edema, o que reduz a proliferação vascular e diminuição de elementos celulares tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos, desencadeando, por conseqüência, uma baixa síntese de colágeno e riscos de infecções.

A ferida realizada no dorso do animal foi do tipo linear. Apesar deste tipo de ferida não traduzir o ambiente característico de uma úlcera, as sucessivas retiradas de amostras, foram importantes para simulação de um processo inflamatório persistente, assemelhando-se ao processo de uma úlcera.

A definição da densidade de energia para aplicações da radiação LASER continua sendo ponto de divergência. Segundo Baxter (2003) a densidade de energia pode variar de menos de 1 para mais de 30 J/cm<sup>2</sup>. Especificamente para tratamento de feridas, indica-se que a dose não deve ultrapassar 10J/cm<sup>2</sup>. Contrário a esses dados os estudos realizados por Mendez (2002) e Baldan (2005), sugerem melhores resultados no tratamento de feridas, utilizando doses acima de 10J/cm<sup>2</sup>.

A densidade de energia definida para este estudo baseou-se no protocolo clássico de Mester que indica 4J/cm<sup>2</sup> (MESTER, E.; MESTER, A. E.; MESTER, A., 1985).

O comprimento de onda e densidade de energia são fatores predominantes para o sucesso da terapia laser no tratamento de cicatrização de feridas (TURNER; HODE, 2000). Para a realização deste estudo, foi utilizada uma emissão de LASER de HeNe com 632,28 nm de comprimento de onda, por ser indicado na literatura como uma faixa de irradiação que promove melhores resultados em tecidos superficiais (LOOW; RED, 2001; KITCHEN; BAZIN, 2003). Apesar de não existir

consenso com relação à profundidade de penetração do laser, o que parece existir é uma dependência da profundidade com o comprimento de onda, forma de apresentação (pulsada ou contínua), potência de saída e técnica de aplicação. Além destes fatores, a penetração depende também do tipo de tecido irradiado e das condições de assepsia da pele (COLLS, 1984; VEÇOSO, 1993). Porém segundo KARU et al. 1995, a irradiação com LASER de 633 nm aumenta o potencial de membrana da mitocôndria com conseqüente aumento na produção de Adenosina Trifosfato (ATP). Como critério de confiabilidade, realizou-se uma calibração prévia do equipamento de radiação LASER para verificar o comprimento de onda (632,28 nm) (laudo em anexo) e durante os 15 dias de realização da experimentação o equipamento foi manuseado unicamente pela pesquisadora, durante as aplicações experimentais.

Neste estudo com a aplicação de estimulação elétrica, optou-se pela utilização de uma corrente elétrica com pulsos bifásicos, quadrados com inversão de polaridade a cada 3 s. Porém, quando levado o aparelho para análise morfológica da corrente, esta não apresentou o padrão esperado. Foi observado que o circuito gerava pulsos bifásicos com dois padrões: um durava 24 s e tinha as características esperadas, enquanto o outro se caracterizava por uma duração de 16 s e não apresentava simetria na forma de onda dos pulsos gerados, havendo, entretanto, simetria de carga entre as frações positiva e negativa dos pulsos. Apesar da modificação do padrão da onda, não se esperava interferência no resultado, em função do longo período de permanência do estímulo em cada pulso. A intensidade de 100  $\mu$ A foi confirmada pela medida (indireta) da corrente empregando um osciloscópio. O fabricante estipula, no manual, uma margem de erro de 15%. As medidas realizadas da intensidade de corrente mostraram erros inferiores aos indicados pelo fabricante. A opção por este nível de intensidade, baseou-se no trabalho de Cheng et al. (1982), cujos resultados mostram que a estimulação elétrica de baixa intensidade, na faixa 100  $\mu$ A, aumentava a geração de Trifosfato de Adenosina (ATP) em até 300%. Quando a intensidade era aumentada, passando a intensidade de corrente para miliamperes, o resultado de geração de ATP regredia.

Para a análise quantitativa de colágeno, utilizaram-se lâminas confeccionadas com material biológico coletado especificamente no 5º, 7º e 15º dia. A opção por

uma análise mais tardia sustenta-se em função da deposição de colágeno aumentar progressivamente após a lesão. O processo de formação do colágeno é característico da segunda fase do reparo (fase proliferativa), sendo dependente da formação das células do tecido de granulação e da neoformação de vasos (fase inflamatória). A fase proliferativa precede o tecido cicatricial maduro, tendo seu início por volta do 3º ou 4º dia, sendo que por volta do 14º dia, após a lesão, atinge seu pico máximo (CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2001; ROCHA, 2004; BALBINO; CURI, 2005; BRASILEIRO, 2004). Reforçando esta idéia, Watson (2003) afirma que a contração da ferida inicia-se logo após a lesão e tem seu auge no 15º dia pós-lesão.

Neste estudo, as densidades de colágeno tipo I e tipo III foram analisadas por meio da coloração de *Picrosirius*. Segundo Junqueira, Bignolas e Brentani (1979), a análise da imagem microscópica com lente de polarização destaca o procedimento como bom método para estudo dos diferentes tipos de colágeno. Este método de coloração e análise determina um padrão de coloração para as fibras colágenas tipo III em tonalidades de amarelo e verde como ilustrado na figura 7. As fibras do tipo I, fortemente birrefringentes, apresentam-se na cor laranja e/ou vermelho (figura 9).

A avaliação do colágeno, no processo de cicatrização, vem sendo alvo de inúmeros estudos tais como os de BOULTON; MARSHALL, 1986; BOURGUIGNON G, WENCHE e BOURGUIGNON, 1989; CARVALHO, MAZZER e SIQUEIRA, 2003; DUNN, 1998; LUBART, FRIEDMANN, PELLÉD e GROSSMAN, 1992; PARIZOTTO, 1998. O colágeno desempenha uma função dinâmica no processo de cicatrização. A quantidade, o tipo dessa proteína e a determinação adequada da taxa sintetizada e destruída são imprescindíveis para o sucesso do processo de reparo tecidual. No tecido de granulação, verifica-se a presença de colágeno tipo I e tipo III. A resistência da cicatriz depende do colágeno tipo I, formada por fibras mais firmes, que do tipo III.

### **5.3 DOS RESULTADOS**

A análise dos resultados compreendeu uma etapa semi-quantitativa e outra quantitativa. Na primeira, os elementos analisados foram os neovasos e as células do tecido de granulação. O objetivo foi verificar a influência dos tratamentos LASER, estimulação elétrica e diclofenaco de sódio na quantidade daqueles elementos, ao longo do experimento. O tecido de granulação tem uma composição rica em matriz extracelular, neovasos, macrófagos e fibroblastos suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e III. As células do tecido de granulação são responsáveis pela fibroplasia (processo de proliferação e migração de fibroblastos – produção de colágeno). A angiogênese, por sua vez, é um aspecto fundamental da fase proliferativa. Um rico sistema vascular é fundamental para suprir as necessidades de formação de elementos cicatriciais, existindo uma relação fundamental entre a quantidade de vasos na ferida, quantidade suficiente de oxigênio e a formação de procolágeno e, conseqüentemente, colágeno (CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2001; CARVALHO, 2002; BRASILEIRO, 2004; BALBINO, 2005). Pode-se observar a importância e a correlação dos elementos que foram estudados nesta pesquisa.

Os resultados encontrados neste estudo evidenciam que no 7º dia, o número de células do tecido de granulação apresentou aumento significativo no grupo tratado com LASER em comparação ao grupo tratado com D.C.F ( $p=0,037$ ). Com relação à neoformação de vasos, houve melhora significativa com o tratamento do LASER HeNe comparado com o grupo tratado com D.C.F ( $p=0,002$ ), observa-se também diferença significativa, quanto a neovascularização, entre o grupo de animais tratados com corrente elétrica e o que recebeu doses diárias de D.C.F ( $p=0,032$ ). Isso indica que no 7º dia de tratamento ocorreu um pico de atividade com laser e corrente elétrica, dado concordante com alguns achados de pesquisa como o trabalho de Wietzkoski et al. (2005), que demonstraram alteração entre o 3º e 7º dia. Viscensi e Carvalho (2002) constataram uma diferença significativa na neoformação vascular com tratamento do laser AsGa após a indução da inflamação em joelho de rato, também no 7º dia de tratamento.

O aumento significativo no número de células do tecido de granulação no grupo tratado com LASER justifica-se por inúmeras evidências, demonstradas em trabalhos anteriores (LUBART et al., 1992 e VAN ; BAR, 1992). É conhecido que as

células são sensíveis, à radiação LASER, a energia eletromagnética estimula os fotoreceptores (enzimas, membranas moleculares). Uma vez a luz sendo absorvida pela célula, ocorrerá uma cascata de reações como o aumento da produção de ATP e atividade respiratória celular agindo diretamente sobre a mitose celular (KARU et al. 1995; BAXTER, 1997).

Na cicatrização, a neoformação de vasos corresponde a um parâmetro importante para o perfeito encadeamento do processo (WIETZILKOSKI et al., 2003; CARVALHO; MAZZER; SIQUEIRA, 2003; WATSON, 2003; BOULTON; MARSHALL, 1986). A angiogênese é estimulada por inúmeros estímulos. A migração de células endoteliais em direção à lesão é um fator importante para a angiogênese (CLARK et al., 1982)

Os possíveis mecanismos da estimulação elétrica, que podem justificar a aceleração da formação de neovasos, observados no 7<sup>o</sup> dia pós lesão, podem estar baseados em achados de pesquisa *in vitro*, que demonstram a migração celular (galvanotaxia).

Foi possível observar que no 5<sup>o</sup> dia pós-lesão, o grupo tratado com estimulação elétrica respondeu com uma formação de vasos significativa quando comparado com o 15<sup>o</sup> dia de lesão. Este achado é concordante com o trabalho de Weiss et al. (1999) que mostra uma neoformação de vasos mais acentuada na fase inicial de formação do tecido de granulação. Este incremento na produção de ATP, associado à maior permeabilidade da membrana, explicaria o efeito da estimulação elétrica no incremento da formação de vasos, observada no 5<sup>o</sup> em relação ao 15<sup>o</sup> dia pós-lesão (gráfico 2). Neste estudo, os dados obtidos com a corrente elétrica sugerem que o efeito desta terapia foi mais intenso na formação de vasos nos primeiros dias pós-lesão (1<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup>), quando comparados com o grupo tratado com laser (7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup>).

O grupo tratado com D.C.F apresentou variação significativa do número de vasos entre o 5<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> ( $p=0,037$ ) e entre o 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> ( $0,012$ ) dias pós lesão. Este dado reforça os achados de literatura que identificam o efeito desta droga nas fases mais iniciais do processo inflamatório (PRANDI, 1988; RANG, 2001). O 2<sup>o</sup> e o 5<sup>o</sup> dia apresentaram um número de vasos mais significativos que o 7<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> dias.

Algumas evidências de pesquisa podem explicar a angiogênese significativa observada no grupo tratado com LASER. Segundo Yu et al. 1994 diferentes comprimentos de onda (630; 640; 650; 660 nm) foram eficientes para ativar fatores de crescimento (TGF $\beta$ ; PDGF) ligados ao processo de reparação tecidual. O TGF $\beta$  é uma citocina com inúmeras atividades biológicas, entre elas a estimulação de quimiotaxia, proliferação dos fibroblastos, atividade miogênica e angiogênese.

Os estudos de Passarella et al. (1988) e Cheng (1982) podem justificar os resultados encontrados no aumento da produção de fibras colágenas tipo III, observadas no 15º dia pós-lesão (gráfico 3) no grupo tratado com corrente elétrica. As fibras de colágeno tipo III (jovens) são originárias do intenso metabolismo do fibroblasto (alto consumo de ATP). A neoformação vascular serviria como fonte de nutrientes e oxigênio, além de meio de condução de células fibroblásticas, contribuindo sobre maneira para o processo cicatricial. Ainda dentro deste contexto a figura 7 demonstra intensa coloração verde/amarelada nos grupos tratados com LASER e corrente elétrica no 15º dia do experimento. Esta tonalidade é característica de intensa densidade de colágeno. Dados que podem se somar para o entendimento desta fibroplasia incluem: a abertura dos canais de Ca<sup>2</sup> na membrana dos fibroblastos, com subsequente impregnação de insulina nos receptores das células e aumento na produção de colágeno e na síntese do DNA, dados observados por Bourguignon et al., 1989. Os estudos de Passarella et al. (1988) e Cheng et al. (1982) relatam aumento, respectivamente, de 70% e de 300 a 500% na síntese de adenosina trifosfato, após a utilização de estimulação elétrica. Assim, poder-se-ia esperar que as correntes elétricas produzissem um efeito de aceleração na fase proliferativa.

Segundo Baynes (2000), a quantidade de colágeno aumenta com o tempo e, por volta de duas semanas, suas fibras passam a predominar na matriz extracelular. Pode-se observar pelo gráfico 3 que houve um aumento quantitativo e progressivo da produção de colágeno tipo III (colágeno jovem) do 7º dia em relação ao 15º dia, nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica. Esse comportamento que não é constatado no grupo tratado com D.C.F. Tal resultado era esperado em função da terceira fase do processo de reparo, atingir seu pico após duas semanas da lesão.

A terceira e última fase do processo inflamatório é conhecida como remodelamento ou reparo. Caracteriza-se por substituição da matriz extracelular. Na proporção em que o tecido cicatricial amadurece o colágeno maduro (tipo I) aumenta gradativamente. Parcialmente, o colágeno tipo III (imaturo) vai sendo absorvido e substituído por um tipo de colágeno mais resistente. Analisando o gráfico 4, constata-se esta tendência nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica. Este estudo, direcionou-se especificamente à avaliação das primeiras fases do processo inflamação/reparo; portanto, as curvas apresentam comportamento esperado, com valores mais expressivos referentes ao colágeno tipo III (gráfico 4) e valores menos expressivos de colágeno tipo I (gráfico 5).

Os dados semi-quantitativos e quantitativos, obtidos neste estudo, indicam resultados favoráveis tanto para o LASER quanto para a estimulação elétrica quando comparados com o grupo controle.

#### **5.4 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Os processos ulcerativos cutâneos são responsáveis por um elevado índice de mortalidade/morbidade. Apesar das muitas opções para acelerar o processo de cicatrização, estes recursos são caros e muitas vezes ineficientes. O tratamento aplicando LASER e estimulação elétrica, apesar de serem utilizados com o objetivo de acelerar o processo de reparação tecidual, ainda necessitam de mais estudos, já que os resultados clínicos dependem de inúmeras variáveis.

Algumas questões merecem ser objeto de novas pesquisas. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental com uma ferida linear, este tipo de lesão não traduz um modelo ideal para o estudo da reação inflamatória em úlceras. Em novos estudos, com objetivo de estudar os efeitos dos recursos terapêuticos aplicados em úlceras, sugere-se o desenvolvimento de uma lesão por avulsão. Esse modelo experimental poderia simular, de forma mais adequado o processo inflamatório de uma úlcera. Além disso, pode-se destacar a necessidade da realização de estudos mais aprofundados para a compreensão dos mecanismos de ação da radiação LASER e da corrente elétrica nos tecidos biológicos.

Tendo o conhecimento das inúmeras variáveis físicas relacionadas com a aplicação da eletroestimulação e da laserterapia no reparo de pele e sua repercussão direta sobre a aplicação clínica, sugere-se extensão dos estudos correlacionando: (1) diferentes comprimentos de onda da radiação LASER; (2) diferentes densidades de energia da radiação LASER; (3) diferentes intensidades de estimulação elétrica; (4) variações no tempo de aplicação da estimulação elétrica; (5) análise dos efeitos da aplicação conjunta e seqüencial da estimulação elétrica e do LASER no processo de reparação tecidual.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

A análise semiquantitativa indica um pico de ação do LASER e da estimulação elétrica na neoformação de vasos no sétimo dia pós-lesão, quando comparados ao grupo tratado com diclofenaco de sódio (controle). Com relação às células do tecido granulação, o grupo tratado com LASER apresentou maior efetividade na proliferação celular, quando comparado com grupo controle.

A análise quantitativa apresentou valores crescentes de colágeno tipo III (imaturo) do 7º em relação ao 15º dia nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica, quando comparados ao grupo controle.

A análise semi-quantitativa, somada à análise quantitativa, mostrou que o LASER e a estimulação elétrica podem ser aplicados no processo de reparação de feridas na pele de ratos com igual eficácia, quando comparados ao controle (D.C.F).

Pelos dados coletados, há um indicativo terapêutico de que uma aplicação conjugada de estimulação elétrica e do LASER proporcionariam resultados mais efetivos e mais rápidos no processo de cicatrização de feridas.



## REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R.; CORREA, I. F.; RIBEIRO, W.; COGO, C.; ABTUNES, E.; TEIXEIRA, T.; NUCCI, G.; FARIA, H.; AIMBIERE, F. S. C.; ZÂNGARO, A. R.; LOPEZ, B.A. R. Análise do efeito do laser de baixa potência (AS-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata de ratos. **Fisioterapia Brasil**, v. 43, n.3(4), p.223-230, 2002.

ALCAIDE, R. A Terapia por microcorrentes elétricas. **Jornal Fisiobrasil**, Rio de Janeiro, n.8, jan-mar, 1998.

ALCAIDE, R. A.; ALMEIDA, S. F. Microcurrent therapy in the acute process of partial muscular rupture of the rectus femoris. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.25, n. 4, p. 47-54, 2001.

ALVAREZ, O. M.; MERTZ, P.M.; SMERBECK, R.V.; EAGLSTEIN, W.H. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. **J. Invest. Dermatol**, v. 81, n. 2, p. 144, 1983.

ANDERSEN, M.L. **Princípios éticos e práticas do uso de animais de experimentação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 44-100.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. The optics of human skin. **J invest. Dermatol**. 77:13-19, 1981.

ARANCIBIA, V. Antiinflamatorios no esteroidales. **Boletim de anestesiologia, Sociedade de anestesiologia do Chile**, Edición, Septiembre de 2000.

ASSIMACOPOULOS, M. Low intensity negative electric current treatment of ulcers of leg due chronic venous insufficiency. **America Journal of Surgery**, 1968.

BAKER, L.L.; CHAMBERS, R. DEMUTH, S.K.; VILLAR, F. Effects of electrical stimulation on wound healing in patients with diabetic ulcers. **Diabetes Care**, v. 20, n. 3, p. 405-412, mar.1997 Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list_uids)>. Acesso em: 30 jun. 2003.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. N., CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 27-51, 2005.

BALDAN, CRISTIANO. **Ação do laser vermelho de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos**. 2006. Dissertação (Mestrado em bioengenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: [www.usp.br](http://www.usp.br) . Acesso em: 01 de out. 2006.

BASTOS, S. R. C. **Tratado de eletroacupuntura: perspectivas científicas, teoria e prática.** Rio de Janeiro: Revinter, 1993.

BAUERMANN, L.F., ROMERO, C.H, CASAGRANDE, R., AGNE, J.E., DALL'AGO, P., SILVEIRO, A.F. Estudo da cicatrização de feridas em diabetes Mellitus. In: **Anais Fesbe**, 2001. p.81, São Pedro, 2001.

BAYNES, J. DOMINICKZAC, M. **Bioquímica Médica.** São Paulo: Artes Médicas; 2000.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências.** 11. ed. São Paulo: Manole, 2003. p 313-334.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1997. 258 p.

BAXTER, G.D.; BELL, A.J.; KAREY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northean Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

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

BECKER, R. O. Stimulation of partial limb regeneration in rats. **Nature**, v. 235, p. 109-111, 1972.

BECKER, R. O.; MARINO, A. A. **Eletromagnetism & life.** Albany: State University of New York, 1982.

BECKER, R. O., SPADARO, J. A. Electrical stimulation of partial limb regeneration in mammals. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 48, n. 4, p. 627-641, 1972.

BECKERMAN, H. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v.72, p 483-491, 1992.

BERTOLINI, F. R. G. **Proposta de ensaios e avaliação de equipamentos laser de baixa potencia empregados em fisioterapia.** Dissertação – (Mestrado em Engenharia elétrica e informática industrial).Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Curitiba, 2003.

BISHT,I.; MESTER, A. The biostimulative affect of low level laser therapy of long-standary criral ulcer using helium neon laser, helium neon plus infrarede lasers an non coherent light: Preliminary report of a randomized double bind comparative study. **Laser Therapy**, v.1, n. 2, p.97, 1989.

BOGIE, K.M.; REGER, S.I.; LEVINE, S.P. SAHGAL, V. Electrical stimulation for pressure sore prevention and wound healing. **Assist. Technol.** v.12, n. 1, p. 50-66, 2000. Disponível em: [www.ncbi.nlm.gov/entrez/query/pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query/pubmed&list_uids). Acesso em: 30 junho 2003.

BOULTON, M. & MARSHALL, J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers in Life Sciences**, v. 1, p.125-134, 1986.

BOURGUIGNON, G. WENCHE, J. BOURGUIGNON, L. Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in Ca<sup>2+</sup> influx and the exposure of additional insulin receptors. **J. Cell Physiol**, v. 149, n. 2, p. 397-85, 1989.

BRAGA, E.S.; FREDERICO, B.R.; MENDES, E.C.; BORGES, F.S. Efeitos biofísicos, fisiológicos e terapêuticos da microcorrente : uma revisão. **Revista Brasileira de Fisioterapia Dermato-Funcional**. v.1, n.3, p.30-35, 2002.

BRASILEIRO Filho, G. **Bogliolo-Patologia geral básica**. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000.

CAMERON, Michelle. **Physical agents in rehabilitation from research to practice**. 2.ed. St. Louis: Saunders-Elsevier, 2003.

CARLEY, P.J.; WAINAPEL, S.F. Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity current. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v. 66, p. 443-446, 1985. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/entrez.fcgi.pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez.fcgi.pubmed&list_uids)>. Acesso em: 30 Junho 2003.

CARVALHO, P. T.C. Os efeitos do laser de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes experimental. **Fisioterapia Brasil**. Rio de Janeiro, v.2, n.4, p. 241-246, 2002.

CARVALHO, P.T.C., MAZZER, N., SIQUEIRA, J.V.L. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser He-Ne. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, p.253-257, 2003.

CHENG, N., VAN HOFF, H., BOCKX, E. The effect of electric currents on ATP generation protein synthesis, and membrane transport in rat skin. **Clin Orthop**, v. 171, p. 264-272, 1982.

CHEN, C. Molecular and mechanistic validation of delayed healing wound as a model for human chronic wounds. **Wound Repair Regeneration**. Chicago, v.7, p. 486-494, 1999.

CHU, C.S.; MATYLEVICH, N.P.; MCMANUS, A.T.; PRUITT JR., B.A.; GOODWIN, C.W. Direct current reduces wound edema after full-thickness burn injury in rats. **Journal of Trauma**, v. 40, n.5, p. 738-742, 1996.

CLARCK, R.A.F & HENSON, P.M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1988. p. 3-33.

CLARCK, R.A.F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, p.701-725, 1985.

COLLINS, K. Efeitos térmicos. In: Kitchen, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Claytons**. 10. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 89-104.

CONTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.44-100.

CUZZEL, J.; KRASNER, D. Curativos, In: Gogia P. **Feridas: tratamento e cicatrização**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.1-3-114 .

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1-21.

DIEZ DE LOS RIOS, A. La irradiación del laser He-Ne y As-Ga por los tejidos biológicos . **Inv. Clin. Laser**, v. 4, n. 3, p. 98-101, 1987.

DUELAND, R.; HOFFER, R.E.; SELGEN, W.A.; BECKER, R.O. **The effects of low voltage current on healing of thermal third degree wounds**. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/entrez/query-pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query-pubmed&list_uids)>. Acesso em: 30 jun 2003.

DUNN, M.G. Wound healing using collagen matrix: Effect of DC electrical stimulation, **Journal of Biomedical and Material Research**, v. 22, p.191-206, 1998.

EBERHARDT, A.; SZCZYPIORSKI, P.; KORYTOWSKI, G. Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition off skin exudates. **Acta Physiol Pol.** n. 37, v. 1, p. 41-46, 1986.

ENWEMEKA, C. S.; Rodriguez, O. Gall, N. G. Correlative ultrastructural and biomechanical changes induced in regeneration tendons exposed to laser photostimulation. **Laser in Surgery and medicine**, v 2, 1990.

FALCONE, A.E.; SPADARO, J.A. Inhibition effects of electrically activated silver material on cutaneous wound bacteria. **Plast. Reconstr Surg.** v. 77, n. 3, p. 455-459 mar. 1986.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M.A. Lasers effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, v. 154, n. 155, p. 548-554, 2000.

GABBIANI, G.; RAYAN, G.B.;MAJNO,G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and posible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 549-550, 1970.

GARDNER, S. E.; FRANTZ, A. R.; SCIMIDT, F.L. Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, 1999.

GODBOUT, C., FRENETTE J. Periodic Direct Current Does Not Promote Wound Closure in an In Vitro Dynamic Model of Cell Migration. **Physical Therapy**, n.86, 2006.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

HERASCU, N.; VELCIU, B.; CALIN, M.; SAVASTRU, D.; TALIANU, C. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Efficacy in Post-operative Wounds. **Photomedicine and laser surgery**, v.23, n.1, 2005.

HUSSNI, C. A.; GIANINI, C. G. Second intention skin wound healing. **Archives of veterinary Science**, v.9, n.1, p. 87-99, 2004.

JUNQUEIRA, G. BIGNOLAS, R. BRENTANI, R. **Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection** The Histochemical Journal, v. 65 447-455, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1995.

KARU, T. Mechanisms of low power laser light action on cellular level. In SIMUNOVIC, Z. **Lasers in medicine and dentistry: basic Science and Up-to Date Clinical Application of low-energy level laser therapy-LLLT**. Croácia, Viatgraf, 2000. p. 97-125.

KARU, T. **Photobiology of low-power laser therapy**, v.8. London: Harwood Academic Publishers, 1989.

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

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KIRSCH, D.L. **Microcurrent electrical therapy: a practical protocol for electromedical treatment of pain**. Disponível em: <[www.alphastim.com/information/techonology/protocol](http://www.alphastim.com/information/techonology/protocol)>. Acesso em: 06 jun. 2002.

KIRSCH, D.L.; LERNER, F. N. **Clinical applications eletromedicine: the other side of physiology**. Guia Oficial da Academia Americana de controle da dor. Disponível em: <[www.alphastim.com/techonology/electromed](http://www.alphastim.com/techonology/electromed)>. Acesso em: 28 maio 2002.

KIRSCH, D.L.; LERNER, F. N. **Microcurrent electrical therapy (MET), eletromedicine: the other side of physiology**. Disponível em:

<[www.alphastim.com/information/techonology/electromed](http://www.alphastim.com/information/techonology/electromed)>. Acesso em: 28 maio 2002.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia prática baseada em evidências**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2003.

KLOTH L. C. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. **Lower extremity wounds** v. 4, n. 1, p. 23-44, 2005,

LAMPE, E. Clinical studies of eletroterapy and tissue healing. **Journal of hand therapy**, v.1, n.2, april 1998 p131-139.

LARK, M. W, LATERRA, J., CULP, L.A. Close and focal contact adhesions af fibroblastos to a fibronectin-contatining matrix. **Fed Proc**, v. 44, p. 394-493, 1985.

LOOW, J. & REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios práticos**. São Paulo: Manole, 2001. p. 389-409.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; PELLER, I.; GROSSMAN, N. Light effect on fibroblast proliferation. **Laser ther**, v. 5, p. 55-57, 1993.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y; FRIEDMANN, H; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near infrared lasers on cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 12 n. 3, feb. 1992. p 305-310.

LUBBERS, M.J. Would healing: trick, art or science. 15<sup>th</sup> ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN TISSUE REPAIR SOCIETY, Anais da Sociedade Europeia de Reparo de pele, 2006.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.D.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An Bras Dermatol**. v. 4, n. 1, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA C.A. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria e estereologia. Rio de Janeiro, CEBIO, 1991. 98 p.

MANTENFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after radiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 38, p. 25-30, 1997.

MATYLEVICH, N.P.; CHU, C.S. Direct current reduces plasma protein extravasation after partial-thickness burn injury in rats. Disponível em<[www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list_uids)>. Acesso em: 30 jun 2003.

MEIRELES, G. C. S. Análise comparativa do efeito dos lasers GaAlAs de  $\lambda = 660\text{nm}$  na cicatrização de úlceras por queimaduras em dorso de ratos diabéticos e não diabéticos: estudo histológico. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 5, n.3, 2005.

MELO, C. A. S.; LIMA, A. L. L.A.; BRASIL, I. R. C.; SILVA, O. C.; MAGALHÃES, D. V.; MARCASSA, L. G.; BAGNATO, V. S. Characterization of light penetration in rat tissues. **Journal of clinical laser medicine & Surgery**, v. 19, n. 4, p. 175-179, 2001.

MENDEZ, V. **Avaliação da influência da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas à laserterapia**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2002.

MERCOLA, J. M.; KIRSCH, D. L. The bases for microcurrent electrical therapy in conventional medical practice. **Journal of Advancement in Medicine**, v. 8, n. 2, 1995.

MESTER, E.; MESTER, A. E.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

NELSON, R. **Eletroterapia clínica**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 89-112.

NESSLER, J.P.; MASS, D.P. Direct-current electrical stimulation of tendon healing in vitro. **Clin.Orthop.**, v. 217, p. 303-312. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/entrez/query/pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query/pubmed&list_uids)>. Acesso em: 01 jul 2003.

NEWMAN, S. L., HENSON, J.E, HENSON, P.M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 156, p. 430-442, 1992.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application**. Chichester. Ed Jhon Wiley & Sons, 1991. p. 3-10.

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S.; GONÇALVES, R.C.; PARIZZOTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades. Parte 1 – **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.

OWOEYE, L.; SPEIHOLZ, N. et al. Low-intensity pulsed galvanic current and the healing of tenotomized rat Achilles tendons: preliminary report using load-to-breaking measurements. **Arch Phys Med Rehabilitation**, v. 68, p. 415-418, 1985.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual**: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. Tese (Doutorado) – UNICAMP, 1998.

PARRISCH, J. A.; ANDERSON, R. R. Considerations of selectivity in laser therapy. In: ARNDT, K.A. **Cutaneous laser therapy principles and methods**. London: J. Wiley & Sons, 1983. p. 41-52.

PARRISH, J.; DEUTSCH, T. Laser photomedicine. **IEEE Journal of Quantum electronics**, v. QE-20, n. 12, p. 1386-1396, 1984.

PASSARELLA, S.;CASAMASSIMA,F.;MOLINARI,S.;CARETTO, G.; JIRILLO, E. Increase of proton electrochemical potential and ATP syntesis in liver mitochondria irradiated in vitro by helium neon laser. **FEBS**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PÉCORA, D. D.; BRUGNERA JR, A. **Noções sobre a física do laser**. Disponível em: <www.forp.usp.br>. Acesso em: 15 ago 2003.

PEREIRA, L.E.F. Inflamações. In FILHO, B. G. **Bogliolo patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 130-172.

PEREIRA, G. F. M. Manual de Condutas para Úlceras Neutróficas e traumáticas- **Caderno de Reabilitação de Condutas para Úlceras em Hanseníase**, n. 2, Ministério da Saúde, 2002.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em medicina e biologia**. v. 1 – Generalidades. São Paulo: Roca, 1990.

PRANDI, F. W.; SIMÕES, M. J.; KULAY, J. R., GOLDENBERG, S. Aspecto morfológico e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de algodão no subcutâneo de ratos tratados com diclofenaco sódico. **Acta Círg. Bras.** v. 3, n. 2, p. 32-37, 1988.

PROCHAZKA, M. Some clinical observations after ten years of laser (LLLT) rehabilitation practice. **Laser partner Clinixperience**, v. 11, n. 3, jun. 2000.

PUGLIESE, L. S., MEDRADO, A. P., REIS, S. R. A. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 4, 2003.

RANG, H. P. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBINSON, J. A.; MACKLER, S. L. O. **Eletrofisiologia clinica**: eletroterapia e teste eletrofisiológico. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000.

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

ROGENSKI, N.M.B. ; SANTOS, V.L.C.G. Estudo sobre a incidência de úlceras por pressão em um hospital universitário. **Rev Latino-Am. Enfermagem**, v. 13, n. 4, p. 474-80, 2005.

ROWLEY, B. A., MCKENNA, J.M. WOLCOT, L.E. The use of low level electrical current for enhancement of tissue healing. **Biomedical Scientific Instrumentation**, v. 10, 1974.

SABBATINI, R. M. E. Descoberta da bioeletricidade. **Cérebro & Mente Revista Eletrônica de Divulgação Científica em Neurociência**. Disponível em: <www.epub.org.br>. Acesso em: 12 mar 2005.

SANDOVAL-ORTIZ, M.C. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades-Parte 1, **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 1, p. 221-240, 2001

SANTOS, V. L. C. G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In. Duarte, Y.A.O; Diogo, M.J.D. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 265-306.

SILFAST, W. T. **Laser fundamentals**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

SILVA, R. D. A. **Ação da irradiação por laser de baixa energia HeNe nas alterações musculares causadas pela inoculação de veneno bruto de bothrops jararacussu**: estudo in vivo em ratos. Dissertação (Mestrado) - Universidade estadual de Campinas, 2003.

SIMÕES, N. P.; ALMEIDA, M. F. C.; FURTADO, M. M.; NOHAMA, P. Estudo comparativo do uso do LASER e da estimulação elétrica de baixa intensidade no processo inflamatório da pele de ratos. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – II Congresso Brasileiro de Engenharia Clínica, p. 776-779, 2006.

SMITH, T. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Ther.**, v. 3, p. 19-24. 1991.

SOMMER, A. P.; PINHEIRO, A. L. B.; MESTER, A. R.; FRANKE, R. P. WHELAN, H. T. Biostimulatory window in low –intensity laser activation: Lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **J clin laser med surg**. v. 19, p. 29-33, 2001.

SONNEWEND, D., SILVA, R. C., NICOLAU, R. A., ZÂNGARO, J. L., OLIVEIRA, R. L. J., PACHECO, M. T. T. Análise do processo inicial da reparação tecidual em ratos, após terapia com corrente elétrica de baixa intensidade. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – II Congresso Brasileiro de Engenharia Clínica, p. 764-767, 2006.

SPADARO, J. A.; CHASE, S.E.; WEBSTER, D.A. Bacterial inhibition by electrical activation of percutaneous silver implants. **J. Biomed Master Res**. vol. 20, n. 5, pp. 565-77, 1986.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy**. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books, 1999.

TURNER, A. S. Local and systemic factors affecting wound healing. **Proc Am Equine Pract.** v.4, p. 355-362. 1978.

TURNER, J.; HODE, H. Depth of penetration of laser light in tissue. **Laser Partner clinixperience**, v. 15, n. 3, p. 31, 2000.

UEZONO, H. Effect of weak direct current with silver electrodes on bacterial growth. 1998. Disponível em: [www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list_uids). Acesso em: 30 junho 2003.

VAN BREUGEL, H.H.F.I., BÄR, P. R.D. Power density and exposure time of He-NE laser irradiation are more important than total energy dose in photo biomodulation of human fibroblasts in vitro **Lasers Surg. Med**, v. 12, p. 528-537, 1992.

VAN PAPENDORP, D.H.; JOUBERT, A.M. A comparative study between a DC (direct current) MET (micro-current) electrical field and conventional TENS (transcutaneous electrical nerv stimulation) on ATP level in an Vitro system. Disponível em : [www.apstherapy.com.au/deverdustents.html](http://www.apstherapy.com.au/deverdustents.html). Acesso em : 28 maio 2002.

VEÇOSO, M.C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993. p.143 .

VINCENSI, C., CARVALHO, P.T.C. Efeitos do laser AsGa na inflamação articular aguda induzida em ratos wistar através do adjuvante completo de Freund. **Fisioterapia Brasil**, v. 43 3(4), p. 223-230, 2002.

WATSON, T. Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas: uma revisão do conhecimento atual. In : KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11. ed. cap. 20, Sao Paulo: Manole, 2003. p. 313-334.

WEISS, D.S.; KIRSNER, R.; EAGLSTEIN, W.H. Electrical stimulation and wound healing. **Arch Dermatol**, v. 126, p. 222-225. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list\\_uids](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.pubmed&list_uids)>. Acesso em: 30 jun 2003.

WIETZILKOSKI, E. C, ALMEIDA, M.F.C, BORGES, L.O, POMPEU, A.L, ANDREATTA, K.S. Laser HeNe no processo de cicatrização de feridas na pele de rato. In: **I Jornada de Produção Científica da Faculdade Evangélica do Paraná**. Curitiba, 2003.

WILDEN, L. & KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low –level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of clinical laser medicine & sugery**, v. 16, n. 3, 1998.

XIAOBING, F., WANG, Z., SEENG, Z. Advances wound healing research in China: from antiquity to present. **Wound Repair and regeneration**, v. 9, n. 1, p. 2-10, 2001.

YU, W. The effects of photo-irradiation on the secretion of tgf-b & PDGF from fibroblasts in vitro. **Lasers Surg. Med.**, suppl. 6, p. 8, abstract 34, 1994.

## APÊNDICE 1

Tabela 1: Resultados da análise das lâminas, mostrando os valores percentuais comparativos do número de “muitas” células e “poucas” células da granulosa nos grupos de tratamento.

Dia	Células	LA (%)	D.C.F(%)	P	Células	LA	C.E	P	Células	D.C.F	C.E	P
1º	Muitas	16,7	20,0	1,0000	Muitas	16,7	25,5	1,0000	Muitas	20,0	25,5	1,000
	Poucas	83,3	80,0		Poucas	83,3	75,0		Poucas	80,0	75,0	
2º	Muitas	16,7	45,5	1,930	Muitas	16,7	20,0	1,0000	Muitas	45,5	20,0	0,3615
	Poucas	83,3	54,5		Poucas	83,3	80,0		Poucas	54,5	80,0	
5º	Muitas	16,7	45,5	0,1930	Muitas	16,7	27,3	0,6404	Muitas	45,5	27,3	0,6594
	Poucas	83,3	54,4		Poucas	83,3	72,7		Poucas	54,4	72,7	
7º	Muitas	45,5	0,00	* 0,0379	Muitas	45,5	30,0	0,6594	Muitas	0,00	30,0	0,2105
	Poucas	54,5	100,0		Poucas	54,5	70,0		Poucas	100,0	70,0	
15º	Muitas	30,0	11,0	0,5820	Muitas	30,0	25,0	1,0000	Muitas	11,0	25,0	1,000
	Poucas	70,0	88,9		Poucas	70,0	75,0		Poucas	88,9	75,0	

LA : LASER

D.C.F: Diclofenaco de sódio

C.E: corrente elétrica

P: resultado aplicação do teste Exato de Fisher

\* valor com significância estatística

Tabela 2: Resultados da análise das lâminas, demonstrando os valores comparativos do número de “muitos” vasos e “poucas” vasos nos grupos de tratamento.

Dia	Vasos	LA (%)	D.C.F (%)	P	Vasos	LA	C.E	P	Vasos	D.C.F	C.E	P
1º	Muitas	30,8	63,6	0,2173	Muitas	30,8	46,2	0,6882	Muitas	63,6	46,2	0,4442
	Poucas	69,2	36,4		Poucas	69,2	53,8		Poucas	36,4	53,8	
2º	Muitas	45,5	54,5	1,0000	Muitas	45,5	40,0	1,0000	Muitas	54,5	40,0	0,6699
	Poucas	54,5	45,5		Poucas	54,5	60,0		Poucas	45,5	60,0	
5º	Muitas	30,0	66,7	0,1984	Muitas	30,0	58,3	0,1984	Muitas	66,7	58,3	1,000
	Poucas	70,0	33,3		Poucas	70,0	41,7		Poucas	33,3	41,7	
7º	Muitas	77,8	0,00	* 0,0023	Muitas	77,8	62,5	0,3498	Muitas	0,00	62,5	* 0,0325
	Poucas	22,2	100,0		Poucas	22,2	37,5		Poucas	100,0	37,5	
15º	Muitas	30,0	11,1	0,5820	Muitas	30,0	0,00	1,0000	Muitas	11,1	0,00	1,000
	Poucas	70,0	88,9		Poucas	70,0	100,0		Poucas	88,9	100,0	

LA : LASER

D.C.F: Diclofenaco de sódio

C.E: corrente elétrica

P: resultado aplicação do teste Exato de Fisher

\* valores com significância estatística

Tabela 3 - Resultados da morfometria para densidade de colágeno tipo III.

Dias	Grupo	N	Média	Mediana	Valor de p
5 <sup>o</sup>	C.E	12	13,2	12,23	0,7401
	LA	12	26,93	10,56	
	D.C.F	7	11,51	10,87	
7 <sup>o</sup>	C.E	12	73,61	22,82	0,8256
	LA	12	95,91	33,09	
	D.C.F	12	55,1	36,62	
15 <sup>o</sup>	C.E	11	56,71	53,03	0,0988
	LA	12	49,65	49,26	
	D.C.F	12	23,37	15,67	

LA : LASER

D.C.F: Diclofenaco de sódio

C.E: Corrente elétrica

P: resultado aplicação do teste de Wilcoxon

Tabela 4 - Resultados da morfometria para densidade de colágeno tipo I

Dia	Grupo	N	Média	Mediana	Valor de p
5 <sup>o</sup>	CE	12	401,73	46,17	0,7401
	LA	12	213,56	53,01	
	DCF	7	311,86	17,28	
7 <sup>o</sup>	CE	12	196,34	73,49	0,7983
	LA	12	47,48	35,52	
	DCF	12	595,58	32,52	
15 <sup>o</sup>	CE	11	74,11	30,25	0,9557
	LA	12	231,5	38,61	
	DCF	12	247,25	34,15	

LA :LASER

D.C.F: Diclofenaco de sódio

C.E: corrente elétrica

P: resultado aplicação do teste de Wilcoxon

## ANEXO 1

### Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética da PUC-PR

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade  
Evangélica Beneficente de Curitiba*

*Rua Padre Anchieta, 2770  
80730-000 Curitiba - PR  
Fone: 41 240-5612  
Fax: 41 240-5517*

Curitiba, 09 de maio de 2005.

Naudimar Di Pietro Simões

Prezada Senhora,

Comunicamos a V. Sa. que, em reunião ordinária do dia 05 de maio de 2005, o projeto de pesquisa intitulado "**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DO LASER He-Ne E DA MICROCORRENTE SOBRE A CICATRIZAÇÃO NA PELE DE RATO**" recebeu o seguinte parecer consubstanciado: PESQUISA PENDENTE.

Solicitamos o atendimento prévio das seguintes pendências:

- Esclarecer a responsabilidade de custos, caso estes custos sejam por conta da FEPAR anexar planilha de custo com aprovação da direção administrativa – Financeira, do contrário informar que os custos serão de responsabilidade dos pesquisadores.
- Formatação adequada das referências bibliográficas.

Informamos que estas solicitações deverão ser encaminhados a este Comitê de Ética em Pesquisa dentro do prazo de 15 dias, caso contrário deverá ser protocolado.

Colocamo-nos a disposição para outros esclarecimentos ou orientações necessárias. Sendo o que havia para o momento subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



**Carmen Paredes Marcondes Ribas**

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba



## ANEXO 2

### Parecer Técnico dos Parâmetros do LASER

**ISP**

INSTITUTO SÃO PAULO

*O Shopping do Fisioterapeuta*

Curitiba, 19 de Junho de 2005.

#### Relatório de Manutenção

RT: 4783  
EQUIPAMENTO: VRKC 650  
MARCA: KROMAM  
Nº DE SÉRIE: 0149

SERVIÇO REALIZADO: REVISÃO GERAL E TESTES  
LASER HeNe  
COMPRIMENTO DE ONDA: 632,28nm  
EMISSÃO CONTÍNUA DE 5 mW

Valdinei Vieira  
CREA: PR-73313/TD



Instituto de Ortopedia e Fisioterapia São Paulo  
Rua Desembargador Westphalen 1186  
Rebouças-Curitiba-Pr  
CEP: 80230-100  
[www.institutosaopaulo.com.br](http://www.institutosaopaulo.com.br)



## ANEXO 3

### Parecer Técnico dos Parâmetros da Corrente Elétrica

**ISP**<sup>®</sup>

INSTITUTO SÃO PAULO

*O Shopping do Fisioterapeuta*

Curitiba, 19 de Junho de 2005.

#### Relatório de Manutenção

RT: 4782  
EQUIPAMENTO: NEURODYN STHETIC  
MARCA: IBRAMED  
MODELO: ESTHETIC  
Nº. DE SÉRIE: 1293

SERVIÇO REALIZADO: REVISÃO GERAL E TESTES  
GALV-Corrente galvânica contínua (polarizado) 0 a 30mA  
GMES-Micro-corrente galvânica contínua (polarizado) 0 a 500µA  
MENS-Micro-corrente quadrada com inversão de polaridade positiva e negativa a cada 3 segundos 0 a 500µA

Valdinei Vieira  
CREA: PR-73313/TD



Instituto de Ortopedia e Fisioterapia São Paulo  
Rua Desembargador Westphalen 1186  
Rebouças-Curitiba-Pr  
CEP: 80230-100  
[www.institutosaopaulo.com.br](http://www.institutosaopaulo.com.br)



## ANEXO 4

Morfologia do estímulo elétrico utilizado na pesquisa experimental.

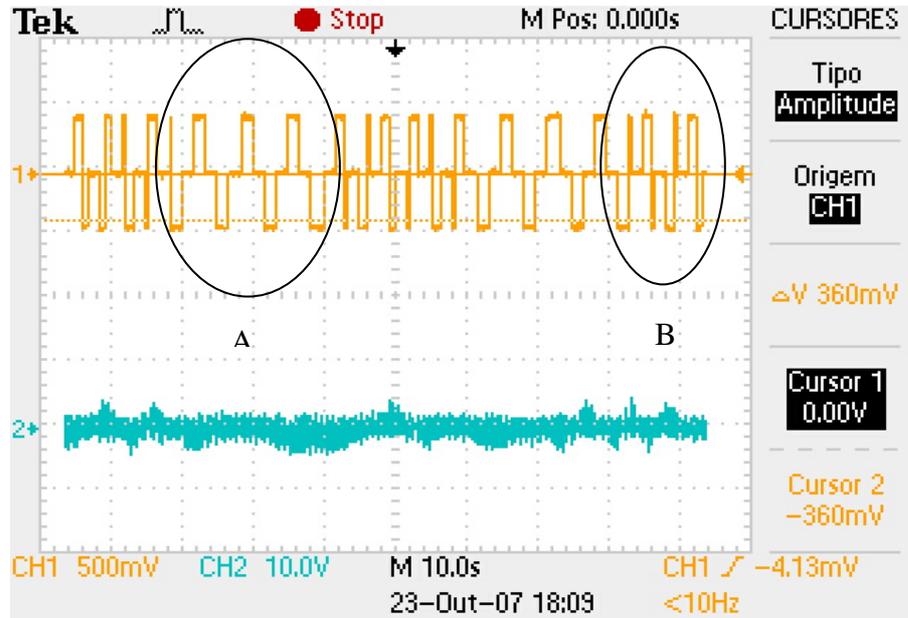


Figura 17 - Características do estímulo elétrico, mostrando a presença de pulsos bifásicos que apresentam dois padrões: um com 24 s de duração com inversão de polaridade a cada 3 s (A) um outro padrão com duração de 16 s apresentando na inspeção visual uma simetria de carga (B).

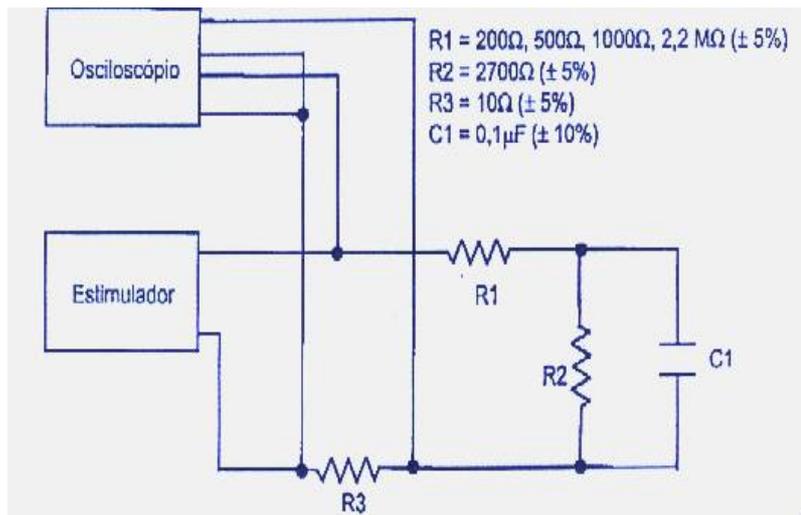


Figura 18- Circuito utilizado nos ensaios de desempenho do estimulador elétrico empregado  
Fonte: Morales, 2003.