
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LASER He-Ne E A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA MICROAMPERADA NA CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS

N.P. SIMÕES¹; M.F.C. ALMEIDA²; P. NOHAMA³

^{1,3}Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde - PUC-PR, Curitiba, PR, Brasil

^{1,2}IBRATE, Curitiba, Brasil

naudipietro@hotmail.com

Abstract

The study had as objective the investigation of the comparative effects of the low-power laser, the electrical stimulation and of the use of Sodium Diclofenaco (DCF) on the inflammatory process of wounds on the skin of mice. On the protocol, 30 male Wistar mice randomly divided in 3 groups of 10 animals were submitted to a wound in the skin and daily treaties with: laser He-Ne (group “L”), 3J/cm²; electric stimulation (group “E”) with intensity of 100µA; and sodium diclofenaco (group “D”), 3mg/Kg. The study suggests a larger effectiveness of the Laser He Ne in the inflammatory process when compared with the electric stimulation.

Key Words: Laser He-Ne, electric stimulation, inflammation, physiotherapy.

Introdução

Os processos ulcerativos cutâneos são responsáveis por um elevado índice de mortalidade e morbidade [8],[12] e freqüentemente são tratados com tecnologias de baixo custo, como laser e estimulação elétrica. Trabalhos publicados indicam a eficácia do laser de He-Ne no processo de cicatrização da pele, assim como a estimulação elétrica tem sido referendada por inúmeros autores [3],[7],[8],[13]. Porém, a literatura consultada não descreve nenhum trabalho de comparação entre as duas tecnologias.

Segundo Contran 2001, a inflamação é uma reação local a uma infecção ou lesão, constituindo-se numa coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reparação do tecido.

Na fase inicial, ocorre liberação de mediadores inflamatórios pré-formados e na seqüência uma segunda onda de substâncias químicas, de natureza lipídica e peptídica são produzidos para promover o reparo tecidual [10],[11]. Esses mediadores químicos desencadeiam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos, aumento do fluxo sanguíneo, liberação de proteínas com conseqüente formação de edema [1],[6],[16],[17]. No estágio inicial a angiogênese é importante para a formação do tecido de granulação, logo após a lesão os fibroblastos e as células endoteliais começam a proliferar para num curto período, variando de 3 a 5 dias, gerar o tecido de granulação que corresponde à marca registrada da cicatrização [1]. As falhas mais importantes do reparo são as que ocorrem nos estágios iniciais, levando à acentuação do edema, redução da angiogênese e diminuição dos elementos celulares (leucócitos, macrófagos e fibroblastos). Essas alterações são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno, além de contribuírem para aumentar os riscos de infecções e formação de cicatrizes desfigurantes [3].

Entre as drogas que interferem na inflamação, os antiinflamatórios não hormonais (AINH) constituem um grupo de drogas bastante usados e atuam, como antiinflamatório e/ou analgésico, dependendo da concentração por mg/K de massa corporal [17].

A laserterapia vem avançando em suas aplicações e seu êxito em reações inflamatórias deve-se às respostas que induz nos tecidos, como: redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, aceleração da mitose, aumento da síntese de colágeno [3].

Por outro lado, pesquisas demonstram que a estimulação elétrica de baixa intensidade, com intensidades inferiores a 1000µA é capaz de acelerar a mitose dos fibroblastos, alinhar as fibras de colágeno, além da desaceleração do crescimento de bactérias [10]. Neste contexto, o estudo de Cheng (1982), com pele de ratos, demonstra a eficácia da estimulação elétrica no aumento de adenosina trifosfato (ATP) [11], no aumento da síntese de proteína e do transporte de aminoácidos pela membrana plasmática [7].

Neste artigo, descreve-se uma pesquisa experimental que compara os efeitos da terapia com laser de baixa potência aos da estimulação elétrica de baixa intensidade e ao uso do DCF sobre o processo inflamatório de feridas na pele de ratos.

Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados nos laboratórios da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba-PR e Pontfícia Universidade Católica do Paraná. O estudo constituiu de uma pesquisa experimental provocada, randomizada, do tipo simples cego, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Evangélica do

Paraná (2109/05). A amostra foi composta por 45 ratos machos adultos Wistar. 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 [18].

Grupo Experimental

Os animais foram randomicamente divididos em três grupos iguais (n=45) e tratados diariamente. O grupo (L) com laser HeNe com comprimento de onda de 632,28 nm, (VR.KC650) Kromam – emissão contínua de 5mW, dose de 4J/cm², por 30 s através da técnica de aplicação pontual (Fig.1C). O grupo E recebeu estimulação elétrica (Neurodyn Estetic, Ibramed), com corrente contínua, pulso quadrado e intensidade de 100µA (Fig. 1B) [9], por 30 s, através da técnica pontual. O grupo D (Diclofenaco de sódico) recebeu injeção intraperitoneal de diclofenaco de sódio, na concentração de 3 mg/kg da massa corporal.

Procedimento Cirúrgico

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 6cm de comprimento foi marcada com uma caneta esferográfica e confirmada com ajuda de um paquímetro (Fig. 1A). Foi utilizado um bisturi lâmina 20 e realizada uma lesão superficial. Os animais foram identificados e tratados durante o período de 15 dias. A retirada das amostras foi realizada no 1º, 2º, 3º, 7º e 15º dia pós-cirurgia. Para isto, os animais receberam novamente a anestesia intraperitoneal, e as amostras com 0,5 x 0,5 cm foram coradas com hematoxilina-eosina [18].



Fig. 1A – Incisão marcada e confirmada com paquímetro
B – Aplicação de estimulação elétrica
C – Aplicação de laser He-Ne

Análise Histológica

Em uma primeira fase as lâminas foram analisadas em um microscópio óptico Model L 2000 A (03 Bioval) e, em seguida, fotografadas com ampliação de 100 x.

Análise Semiquantitativa

Analisou-se a quantidade de células da granulosa e a neoformação de vasos, por serem elementos que permitem avaliar a evolução do processo de reparo tecidual. A codificação usada foi baseada em Pugliese et al. (2003) e Wietzikoski (2005), onde "pouco" foi considerado um número igual ou menor que 10 vasos e células da granulosa; e "muito", como um número maior do que 10, vasos e células da granulosa em um campo escolhido aleatoriamente.

Análise Quantitativa

Para a análise quantitativa foi utilizada a morfometria, através do programa *IMAGE-PRO PLUS*. Foram analisadas a densidade preenchida por colágeno tipo I e III. A calibração do sistema orientou-se pela densidade ótica dos pontos de resolução (pixels) que formavam as imagens. A densidade do colágeno do tipo I e III foram medidas em três campos escolhidos aleatoriamente, à partir da centralização da cicatriz. Foram calculadas as medianas da densidade preenchida pelos dois tipos de colágeno.

Análise estatística

Na primeira etapa do trabalho a análise estatística focalizou na tabulação dos dados de frequência e aplicou-se o teste Exato de Fisher na comparação dentro dos grupos (Statistics for Windows,1996) e entre os grupos, com nível de significância adotado de 5% .

Na segunda etapa do trabalho, foi analisada a densidade de colágeno tipo I (maturo) e o tipo III (imaturo). O objetivo da análise foi comparar os grupos submetidos aos 3 tratamentos, no 3º, 7º e 15º dia pós-lesão, bem como a comparação, especificamente, da quantidade de colágeno tipo III (imaturo) dentro de cada grupo entre o 3º e 15º dias. Para a comparação dos resultados entre os grupos, considerando-se a grande variabilidade e ausência da distribuição normal das variáveis, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com valores de $p < 0,05$ para significância estatística.

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 STATISTICA 5.1.

Resultados

Os resultados serão detalhados, inicialmente com a apresentação dos dados semi-quantitativos referentes às células da granulosa e o número de vasos e posteriormente serão apresentados os dados quantitativos dos tipos de colágeno I e III. A tabela abaixo representa os dados, referentes às células da granulosa, além do resultado do teste exato de Fischer para comparar a existência de diferença significativa entre os tratamentos, em cada dia do experimento.

Dia	Células	LA	D.C.F	P	Células	LA	C.E	P	Células	D.C.F	C.E	P
1º	Muitas	2	2	1,0000	Muitas	2	2	1,0000	Muitas	2	2	1,000
	Poucas	10	8		Poucas	10	6		Poucas	8	6	
2º	Muitas	2	5	1,930	Muitas	2	2	1,0000	Muitas	5	2	0,3615
	Poucas	10	6		Poucas	10	8		Poucas	6	8	
3º	Muitas	2	5	0,1930	Muitas	2	3	0,6404	Muitas	5	3	0,6594
	Poucas	10	6		Poucas	10	8		Poucas	6	8	
7º	Muitas	5	0	0,0379	Muitas	5	3	0,6594	Muitas	0	3	0,2105
	Poucas	6	9		Poucas	6	7		Poucas	9	7	
15º	Muitas	3	1	0,5820	Muitas	3	2	1,0000	Muitas	4	2	1,000
	Poucas	7	8		Poucas	7	6		Poucas	8	6	

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

Células da granulosa

Com relação ao número de células da granulosa na ferida ao longo do período de tratamento, observou-se um aumento significativo no grupo tratado com laser entre o 2º e o 7º dia de aplicação da radiação laser ($p=0,0325$). No grupo tratado com DCF não foi encontrada variação significativa para as células da granulosa ($p>0,05$), assim como para o grupo E (estimulação elétrica), no qual não foi observada variação significativa ($p>0,05$). No 7º dia de tratamento constatou-se uma diferença significativa entre o grupo de animais tratados com laser e o que recebeu doses diárias de DCF ($p= 0,0379$). Os animais que receberam laser apresentaram maior número de células da granulosa.

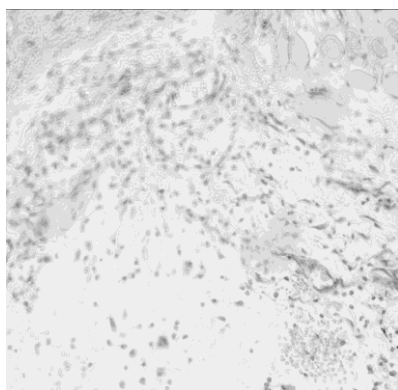


Figura 2 - Células da granulosa no 7º dia - LASER

QUANTIDADE DE MUITAS CÉLULAS

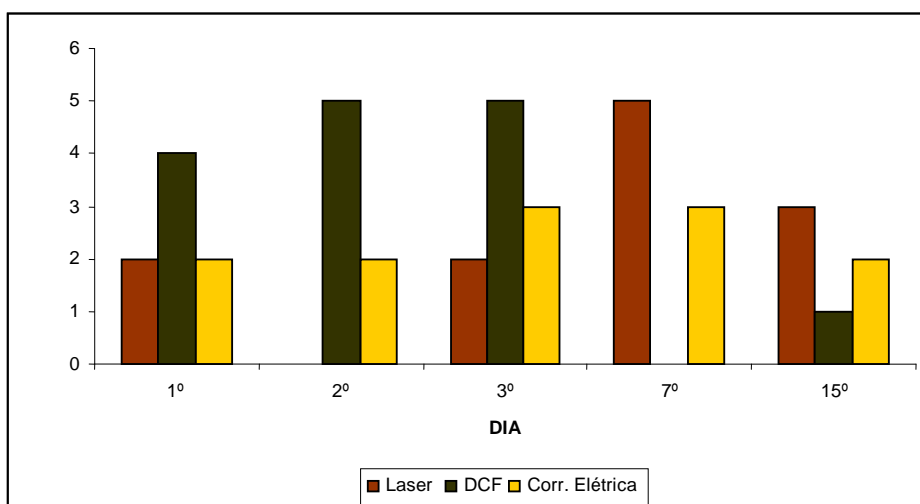


Gráfico-1 Comparação entre os tratamentos DCF, LASER e estimulação elétrica relacionando a ocorrência de “muitas células” da granulosa, por grupo de tratamento, em cada dia do experimento.

* Valor de $p(2^\circ \text{ e } 7^\circ \text{ dia}) = 0,0325$ no tratamento com Laser

Vasos neoformados

Dia	Vasos	LA	D.C.F	P	Vasos	LA	C.E	P	Vasos	D.C.F	C.E.	Valor P
1º	Muitas	4	7	0,2173	Muitas	4	6	0,6882	Muitas	7	4	0,4442
	Poucas	9	4		Poucas	9	7		Poucas	4	7	
2º	Muitas	5	6	1,0000	Muitas	5	4	1,0000	Muitas	6	4	0,6699
	Poucas	6	5		Poucas	4	6		Poucas	5	6	
3º	Muitas	3	8	0,1984	Muitas	3	7	0,1984	Muitas	8	*7	1,0000
	Poucas	7	4		Poucas	7	5		Poucas	4	4	
7º	Muitas	7	0	0,0023	Muitas	7	5	0,3498	Muitas	0	5	0,0325
	Poucas	2	9		Poucas	2	3		Poucas	9	5	
15º	Muitas	3	1	0,5820	Muitas	3	0	1,0000	Muitas	1	*0	1,0000
	Poucas	7	8		Poucas	7	8		Poucas	8	8	

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

* $p = 0,0377$

Quanto aos vasos neoformados na ferida cutânea 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 2º ($p=0,0377$) e 3º dia pós-lesão ($p=0,0128$) - Gráfico 2. No grupo em que foi aplicada estimulação elétrica, verificou-se uma diferença significativa com relação ao número de vasos entre o 3º e o 15º dias de tratamento ($p= 0,0337$), sendo que no 15º o número de vasos é menor.

No 7º dia de tratamento, verifica-se uma diferença significativa entre o grupo de animais tratados com estimulação elétrica e o que recebeu doses diárias de DCF ($p=0,0325$). Para os animais que receberam aplicação da estimulação elétrica o número de vasos foi maior. Também no 7º dia observa-se diferença significativa no número de vasos do grupo tratado com LASER em relação ao controle ($p= 0,0023$).

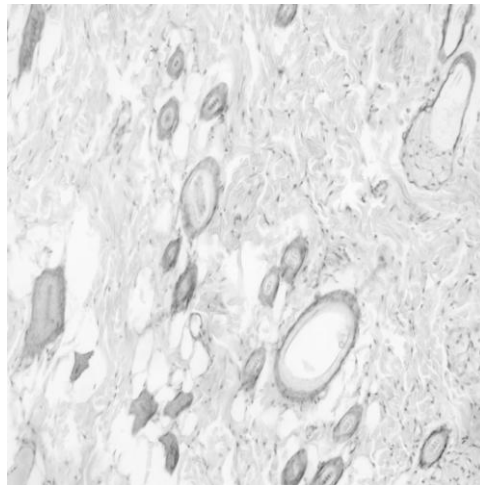


Fig. 3 Vasos no 7º dia- estimulação elétrica

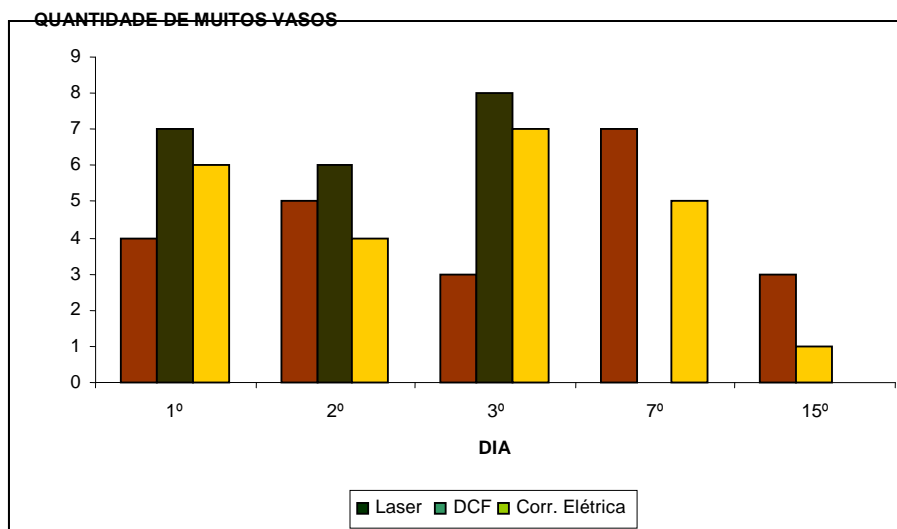


Gráfico 2 - Comparação entre os tratamentos DCF, LASER e estimulação elétrica relacionando a ocorrência de “muitos” vasos neoformados, em cada dia de tratamento.

Densidade de colágeno

Para cada uma das variáveis, em cada momento da avaliação, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 3 grupos do estudo versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Para a densidade de colágeno tipo I e tipo III, quantificada em cada um dos três campos de análise das lâminas (3º, 7º e 15º) foi calculado a mediana. O gráfico 3 demonstra o comportamento da densidade de colágeno em cada um dos grupos de tratamento.

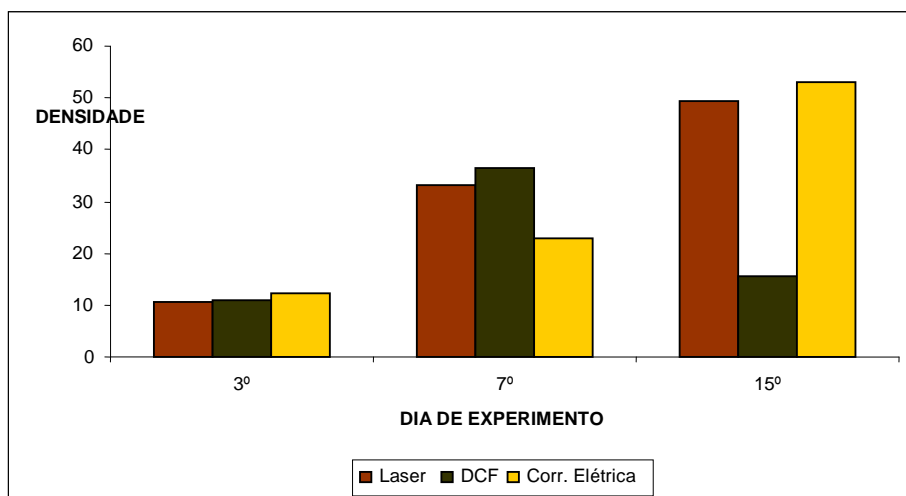


Gráfico 5 - Comparação da quantidade de colágeno tipo III no 3º, 4º e 15º dia, em cada um dos grupos de tratamento (medianas)

As figuras 4, 5 e 6 são resultados da análise microscópica com coloração Sirius-red, respectivamente, do grupo corrente elétrica (CE), LASER (LA) e diclofenaco de sódio (DCF), no 15º dia de pós operatório, utilizando técnica de polarização. Nas figuras 7 e 8 (grupo E e grupo LA) observa-se intensa tonalidade verde/amarelada, coloração específica do colágeno tipo III. Na figura 9 a tonalidade avermelhada é mais intensa, coloração mais específica para o colágeno tipo I.



Fig. 4 Morfometria, demonstrando fibras colágenas tipo III, grupo E – 15º dia



Fig. 5 Morfometria, demonstrando fibras colágenas tipo III, grupo LA – 15º dia



Fig. 6 Mofometria, demonstrando fibras colágenas tipo III grupo DCF- 15º dia.

Para a densidade de colágeno tipo I, quantificada em cada um dos três campos de análise das lâminas (3º, 7º e 15º) foi calculado a mediana. Os resultados comparativos entre os grupos de tratamento se encontra expresso no gráfico 3.

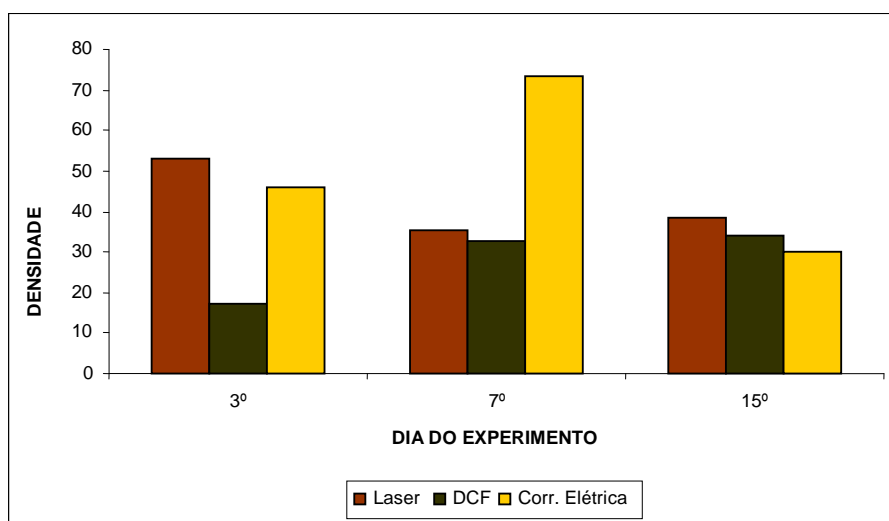


Gráfico 4 - Comparação da quantidade de colágeno tipo I no 3º, 7º e 15 em cada um dos grupos de tratamento (medianas)

As figuras 17, 18 e 9 são resultados da análise microscópica com coloração Sirius-red e técnica de polarização, respectivamente, do grupo: corrente elétrica (CE), LASER (LA) e diclofenaco de sódio (DCF), no 15º dia de pós-operatório. Observa-se intensa coloração vermelha, coloração específica do colágeno tipo I.

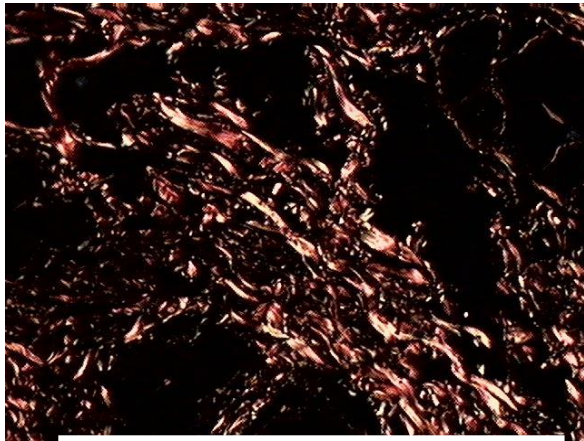


Fig. 7 Morfometria, demonstrando fibras colágenas tipo I, grupo CE – 15° dia



Fig. 8 Morfometria, demonstrando fibras colágenas tipo I, grupo LA – 15° dia



Fig. 9 Morfometria, demonstrando fibras colágenas tipo I, grupo DCF – 15° dia

Discussão

Segundo dados apresentados no 15° Meeting 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 [18].

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 [23].

Dentre os recursos físicos para o tratamento de feridas, destacam-se a indicação do LASER e da estimulação elétrica como 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 [3,8,13,15], quanto para estimulação elétrica [7,19].

O presente estudo experimental constou inicialmente com uma mostra de 45 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), randomicamente divididos e identificados em 3 grupos de tratamento. Os grupos nominados de LASER (LA), corrente elétrica (CE) e diclofenaco de sódio (DCF), foram submetidos a uma lesão de pele superficial, localizada na região dorsal. Os animais foram tratados respectivamente e diariamente, por um período de 15 dias. Para a análise semi-quantitativa, foram utilizadas lâminas confeccionadas com material biológico coletado

no 1º, 2º, 3º, 7º e 15º dia pós-lesão. A escolha destes intervalos foi baseada na expectativa de se evidenciar os efeitos do tratamento na fase inicial do processo inflamatório. Segundo CONTRAN KUMAR e COLLINS (2001), as falhas do reparo que ocorrem nos estágios iniciais, acarretam uma à acentuação do edema, o que reduz a proliferação vascular, bem como, a diminuição dos elementos celulares tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos, desencadeando, por conseqüência, uma baixa síntese de colágeno e riscos de infecções. O objetivo desta análise inicial foi de investigar o número de células da granulosa e o número de vasos encontrados em cada um dos grupos de tratamento (LA, CE e DCF). O estudo destes elementos se justifica em função das células da granulosa, serem, as responsáveis pela fibroplasia (processo de proliferação e migração de fibroblastos – produção de colágeno), por outro lado, a angiogênese 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[1].

Na segunda fase, foram analisadas a densidade de colágeno tipo I e tipo III , por meio da coloração de Sirius-red. 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 tons amarelo e verde, enquanto as fibras tipo I, fortemente biorrefringentes, apresentam-se na cor laranja e/ou vermelho.

O processo de formação do colágeno é característico da segunda fase do reparo (fase proliferativa), sendo dependente da formação das células da granulosa e da neoformação de vasos (fase inflamatória)

O protocolo utilizado no grupo tratado com LASER de baixa potência foi determinado a partir de alguns critérios como: comprimento de onda e intensidade da luz irradiada . O comprimento de onda e densidade de energia são fatores predominantes para o sucesso da terapia laser no que tange a cicatrização de feridas [13],[6]. Para a realização deste estudo foi utilizada uma emissão de LASER de HeNe com 632,28 nm de comprimento de onda (Wietzilkoski, 2003; Parizotto, 1998). Realizou-se uma calibração prévia do equipamento de LASER para verificar o comprimento de onda (632 nm). 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/cm², especificamente para tratamento de feridas se indica que a dose não deve ultrapassar 10J/cm². Contrário a esses dados os estudos realizados por Mendez (2002) e Baldan (2006), sugerem melhores resultados no tratamento de feridas, utilizando doses acima de 10J/cm². No presente trabalho a densidade de energia baseou-se no protocolo clássico de Mester et. al (1985), que indica 4J/cm².

Para a aplicação de estimulação elétrica utilizou-se uma corrente direta com intensidade de 100 µA. Cheng (1982) demonstrou em sua pesquisa que a estimulação elétrica de baixa intensidade, na faixa 100 µA, aumentava a geração de Trifosfato de Adenosina (ATP) em até 300%. Quando a intensidade era aumentada, passando o nível de corrente para miliamperes, o resultado de geração de ATP regredia em percentual.

Os resultados encontrados em nosso estudo evidenciam que no 7º dia, o número de células da granulosa apresentou aumento significativo no grupo tratado com laser em comparação ao grupo tratado com DCF (p=0,0441). Com relação à neoformação de vasos, houve melhora significativa com o tratamento do laser HeNe comparado com o grupo tratado com DCF (p=0,0256), observa-se também diferença significativa entre o grupo de animais tratados com estimulação elétrica e o que recebeu doses diárias de DCF (p=0,0325). Isso indica que no 7º dia de tratamento ocorreu um pico de atividade com laser e estimulação elétrica, dado concordante com alguns achados de pesquisa como o trabalho de Wietzilkoski et al. (2005) que demonstraram alteração entre o 3º e 7º dia. Entretanto, aplicou-se laser HeNe por

varredura e, neste trabalho, a técnica foi pontual. Viscensi e Carvalho, (2002) constataram uma diferença significativa na neofirmação vascular com tratamento do laser AsGa após a indução da inflamação em joelho de rato (grupo de 12 animais) no 7º dia de tratamento. É de consenso na literatura que a neofirmação de vasos é mais acentuada na fase inicial de formação do tecido de granulação [1,6,11,13,15]. Neste estudo, os dados obtidos com a estimulação elétrica sugerem que o efeito desta terapia foi maior na formação de vasos no terceiro dia pós-lesão (fase inicial), quando comparado com o 15º dia pós lesão ($p=0,0377$).

Em 1982, Cheng et al. realizaram pesquisa com retalhos de ratos, aplicando corrente elétrica de baixa intensidade obtendo os melhores efeitos na faixa entre 100 e 5000 μA . O estudo mostrou que o mecanismo de ação da corrente elétrica produz um aumento de 300 a 500% na síntese de ATP e de 30 a 40% no transporte de aminoácidos nas membranas. 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 primeiro dia pós-lesão (gráfico 2).

O estudo de Passarella et al. (2005) relata aumento de 70% na síntese de adenosina trifosfato. Assim, poder-se-ia esperar que a estimulação elétrica produzisse um efeito anterior ao da aplicação de Laser HeNe. Foi possível observar que 3º dia pós lesão, o grupo tratado com estimulação elétrica respondeu com uma formação de vasos significativa quando comparado com o grupo tratado com laser.

O mecanismos pelos quais a estimulação elétrica age sobre a pele, ainda não estão bem explicados. Contudo alguns efeitos fisiológicos tem sido identificados. Baseado nos achados in Vitro, os possíveis mecanismos da estimulação elétrica na pele, incluem a abertura da voltagem-sensitiva dos canais de Ca^2 na membrana dos fibroblastos, subsequentemente a impregnação da insulina nos receptores nas células do rato, aumento na produção de colágeno e na síntese do DNA[19].

Os estudos de Passarella et al. (2005) 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). As fibras de colágeno tipo III (jovens) são originárias do intenso metabolismo do fibroblasto (alto consumo de ATP). A neofirmação vascular serviria como fonte de nutrientes e oxigênio, além de meio de condução de células fibroblásticas, contribuindo sobre maneira para o processo cicatricial.

Segundo Baynes (2000) a quantidade de colágeno aumenta com o tempo de cicatrização e por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar na matriz extracelular. Podemos observar pelo gráfico 3 que houve um aumento quantitativo e progressivo da produção de colágeno tipo III (colágeno jovem), no 3º dia em relação ao 15º dia pós lesão, nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica. Comportamento que não se observa no grupo tratado com DCF, porém a diferença não apresenta significância estatística. Acreditamos que alguns problemas relacionados à confecção das lâminas, possam justificar este achado. A falta de padronização no tamanho das amostras nos limitou o número de lâminas confeccionadas para a análise. 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.

A medida que o tecido cicatricial amadurece o colágeno maduro (tipo I) aumenta gradativamente, parcialmente o colágeno tipo III (imaturo) vai sendo substituído[1],[6],[11]. Analisando os gráficos 4 e 5, podemos observar que as curvas demonstram esta tendência. Nosso estudo se direcionou mais especificamente para avaliar as primeiras fases do processo inflamação/repouso, portanto as curvas apresentam comportamento esperado, com valores mais expressivos referente ao colágeno tipo III (imaturo).

Conclusão

A análise semiquantitativa sugere igual efetividade do LASER e da estimulação elétrica na neoformação de vasos, porém os dados obtidos no grupo tratado com estimulação elétrica sugerem que os efeitos desta terapia sobre a neoformação de vasos é mais significativa na fase inicial do processo de cicatrização (3º dia), quando comparado ao do Laser He-Ne, que apresenta valores mais expressivos em fase mais tardia do processo inflamatório (7º dia). Com relação às células da granulosa, o grupo tratado com LASER apresentou maior efetividade, quando comparado com o grupo tratado com estimulação elétrica.

A análise quantitativa demonstrou valores crescentes na quantidade de colágeno tipo III (imaturo) do 3º em relação ao 15º dia nos grupos tratados com LASER e estimulação elétrica, quando comparados ao grupo tratados com DCF.

A análise semi-quantitativa somada á análise quantitativa, sugerem que a aplicação de laser e estimulação elétrica são efetivas na aceleração da reação inflamatória de ferida na pele de ratos, quando comparada ao grupo controle.

Pelos dados coletados, há um indicativo terapêutico de que, a aplicação conjugada e seqüencial da estimulação elétrica e do laser proporcionaria resultados mais efetivos e mais rápidos.

Referências

- [1] Contran RS, Kumar V, Collins T, Robbins: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 44-100.
- [2] Vincensi C, Carvalho PTC. Efeitos do laser AsGa na inflamação articular aguda induzida em ratos *wistar* através do adjuvante completo de Freund. *Fisioterapia Brasil*. 2002; 3(4): 223-230.
- [3] Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JVL. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser He-Ne. *Fisioterapia Brasil* 2003; 4: 253-257.
- [4] Clark RAF. Overview and general considerations of wound repair. In: Clark RAF, Henson PM. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum; 1988: 3-33.
- [5] Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13:701-725.
- [6] Balbino CA, Pereira LN, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bra de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41(1): 27-51.
- [7] 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*. 1982;171:264-72.
- [8] Corrêa FI, Prado FS, Miranda CM, Souza APG, Corrêa JCF. O uso do laser He-Ne (632,8nm) no fechamento de feridas. *Fisioterapia Brasil*. 2003; 4(2):144-148.
- [9] Vincensi C, Carvalho PTC. Efeitos do laser AsGa na inflamação articular aguda induzida em ratos *Wistar* através do adjuvante completo de Freund. *Fisioterapia Brasil*. 2002;3(4):223-230.
- [10] Bauermann LF, Romero CH, Casagrande R, Agne JE, Dall'ago P, Silveiro AF. Estudo da cicatrização de feridas em diabetes Mellitus. In: *Anais Fesbe* 2001:81.
- [11] Mandelbaum SH, Santis EPD, Mandelbaum MHS. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *An Bras. Dermatol*. 2003;4:1-19.
- [12] Xiaobing F, Wang Z, Seeng Z. Advances wound Healing Research in China: from antiquity to present. *Wound Repair and regeneration*. 2001;9(1):2-10.
- [13] Wietzilkoski EC, Almeida MFC, Borges LO, Pompeu AL, Andreatta KS. Laser HeNe no processo de cicatrização de feridas na pele de rato. In: *I Jornada de Produção Científica da Faculdade Evangélica do Paraná*, 2003.
- [14] Boulton M, Marshall J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro, *lasers in Life Sciences*. 1986;1:125-134.
- [15] Takahashi Y, et al. Neovascularization effect with HeNe laser in the rat trachea. *Surg. Thorac Cardiovasc*. 1992; 40(5):288-291.
- [16] Berne & Levy (1998) *Physiology* Fourth edition 1998 Mosby. *The Biomedical Effects of laser, application*. *Lasers Surgery medicine*, 5:31- (eletroterapia de Clatyon- 10ª edição . Sheila Kitchen e Sarah Beazin. Editora Manole.

-
- [17] Prandi FW, Simões MJ, Kulay JR, Goldenberg S. Aspectos atuais do processo de reparo tecidual. *Acta cirurg. Bras.* 1987;2(1):19-21.
- [18] Andersen ML. Princípios éticos e práticas do uso de animais de experimentação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004:44-100.
- [19] Bourguignon G, Wenche J. Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in Ca²⁺ influx and the exposure of additional insulin receptors. *J. Cell Physiol.* 1989;149(2):397-85.
- [20] Baynes J, Dominickzac M. *Bioquímica Médica*. São Paulo: Artes Médicas; 2000.
- [21] Mandarim-de-Lacerda CA. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria e estereologia. Rio de Janeiro: CEBIO; 1991.
- [22] Lubbers MJ. Wound healing: trick, art or science. 15th Annual Meeting Of The European Tissue Repair Society. *Anais da Sociedade Europeia de Reparo de pele*; 2006.
- [23] Pereira GFM. Manual de Condutas para Úlceras Neutróficas e traumáticas- Caderno de Reabilitação de Condutas para Úlceras em Hanseníase. Ministério da Saúde. 2002;2.
- [24] Junqueira G, Bignolas R, Brentani R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection. *The Histochemical Journal*; 1979.
- [25] Mendez V. Avaliação da influência da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas à laserterapia. [dissertação] Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba; 2002.
- [26] Parizotto NA. 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. [dissertação] UNICAMP; 1998.
- [27] Baldan C. Ação do laser vermelho de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. [dissertação] São Paulo; Universidade de São Paulo; 2006. Disponível em: <http://www.usp.br> (01 out 2006)
- [28] Passarella S, Casamassima F, Molinari S, Caretto G, Jirillo E. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in liver mitochondria irradiated in vitro by helium neon laser. *FEBS*, 2005;175(1).