

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica
Universidade Comunitária Regional de Chapecó
Mestrado Interinstitucional em Engenharia Biomédica

MAURO ANTÔNIO DALL AGNOL

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS BIOMODULADORES DO LED E DO
LASER EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS PORTADORES DE DIABETES
INDUZIDO

São José dos Campos, SP

2008

Mauro Antônio Dall Agnol

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS BIOMODULADORES DO LED E DO
LASER EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS PORTADORES DE DIABETES
INDUZIDO**

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Renata Amadei Nicolau e
Prof. Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos, SP

2008

A218e

Agnol, Mauro Antônio Dall

Estudo comparativo entre os efeitos biomoduladores do LED e do laser em feridas cutâneas de ratos portadores de diabetes induzido / Mauro Antônio Dall Agnol; Orientadores: Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau, Prof. Dr. Wellington Ribeiro. São José dos Campos; Chapecó, 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, modalidade Minter Univap / Unochapecó. 2008.

1. Diabetes 2. Terapia laser de baixa intensidade 3. Cicatrização de feridas
I. Nicolau, Renata Amadei, Orient. II. Ribeiro, Wellington, Co-orient. III.
Título

CDU: 616-003.9

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

Aluno: Mauro Antônio Dall Agnol



Data da defesa: 26/08/2008

MAURO ANTONIO DALL AGNOL

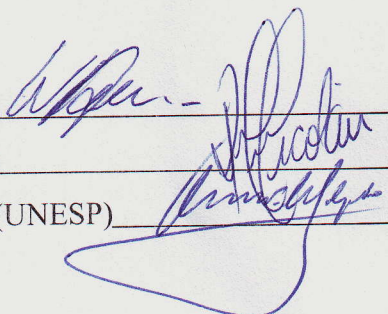
“ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS BIOMODULADORES DO LED E DO LASER EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS PORTADORES DE DIABETES INDUZIDO”

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

Prof. Dr. **WELLINGTON RIBEIRO** (UNIVAP) _____

Prof^a. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO** (UNESP) _____



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 26 de agosto de 2008.

*À Luciara, minha esposa e companheira,
pela paciência e compreensão,
pela torcida e apoio,
pela vibração nos momentos de êxito
e aceitação nos momentos de ausência.
A Deus, por tudo que sou, tenho e acredito.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof^ª. Dr^ª. Renata Amadei Nicolau e Prof. Dr. Wellington Ribeiro pelo incentivo e amizade. Por acreditarem em meu trabalho, pelos ensinamentos no caminho da pesquisa, pela paciência e compreensão. Obrigado por auxiliarem a realizar um grande sonho.

Ao colega da Unochapecó Luis Flavio de Oliveira, pessoa valorosa, que me auxiliou na experimentação animal e a quem serei eternamente grato.

Aos estudantes de Medicina da Unochapecó Laura Zanchett e Gabriel Fachetti Morandini, meus amigos e parceiros de todos os momentos. Sem eles tenho plena consciência que não teria conseguido realizar a parte experimental deste trabalho.

Aos estudantes da Unochapecó Danilo Saladini Rosseto, Elidiana de Bona, Gianfranco Poli, Jackson Bossoni Mendes e Liliane Ângela Ribeiro pelo auxílio na realização dos experimentos.

Ao Carlos Ruiz da Silva, que mesmo à distância não mediu esforços para auxiliar.

Ao amigo Paulo Fernando Fávero pelo apoio e orientações da área veterinária.

Às colegas Tádía Fernanda Lapinski e Silvana Muraro Wildner pelo auxílio, estímulo a continuar e pelo apoio incondicional.

Ao colega Jerso Menegassi e ao Instituto de Patologia do Oeste pelo auxílio na realização deste trabalho.

Às estudantes Emily Pansera Waczuk, Liliane Alves dos Santos Wanderley e Naira Fernanda Zanchett Schneider pelo indispensável auxílio na realização das análises laboratoriais.

Às colegas da Farmácia Escola da Unochapecó Cândida Nissola e Ana Cristina Acorsi Etges pelo pronto auxílio e dedicação.

Aos colegas da Unochapecó Alexandre Meneghello Fuentesfria, Carla Paz Arruda Téó, Ilo Odilon Villa Dias, Leda das Neves Almeida Sandrin, Maria Assunta Busatto, Maria Teresa Granella Lang, Marinez Amabile Antonioli Sandro Chander da Silva, Vanessa Coralo Borges, Vinicius Brandalise e Walter Antonio Roman Junior, pelo incentivo e por dividirem comigo vários momentos de busca de respostas.

Às funcionárias da Unochapecó Adriana Aparecida Grando, Juliana Graciela Fruet, Neusa Müller e Tânia Muneron pelo suporte e auxílio.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Unimed Chapecó pela parceria e pelo apoio à pesquisa científica.

Aos professores da UNIVAP Carlos José de Lima, Dra. Josane Mittmann, Dr. Marco Antonio de Oliveira e Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco pelas sugestões e orientações na construção deste trabalho. Ao prof. Dr. Egberto Munin, pelo empréstimo do equipamento de captura de imagens e pelo apoio na construção desse trabalho.

À bibliotecária Rúbia Gravito Gomes pela amizade, auxílio e dedicação contagiante. Aos funcionários da UNIVAP pelo auxílio e amizade, em especial à Katia Calligaris Rodrigues.

A todos que contribuíram para tornarem esse trabalho possível e que aqui não foram citados, para não tornar essa seção muito longa, meus sinceros agradecimentos e o registro de que a sua participação não foi menos importante.

Muito obrigado!

*“Foi assim que se construiu a ciência:
não pela prudência dos que marcham,
mas pela ousadia dos que sonham.
Todo conhecimento começa com o sonho.
O conhecimento nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido,
em busca da terra sonhada”.*

Rubem Alves

Estudo comparativo entre os efeitos biomoduladores do LED e do laser em feridas cutâneas de ratos portadores de diabetes induzido.

RESUMO

O *diabetes mellitus* é uma das doenças não contagiosas mais comumente encontradas na população mundial. A hiperglicemia associada à doença acarreta várias anormalidades metabólicas que determinam um atraso do processo de reparo de feridas cutâneas. A terapia que tem se mostrado promissora no tratamento dessas complicações é a fototerapia, que apesar desse fato, ainda não possui seus efeitos biomoduladores completamente esclarecidos, principalmente quanto aos mecanismos fisiológicos envolvidos e aos efeitos do emprego da luz emitida por diodo (LED), recentemente inserida nessa modalidade terapêutica. O presente estudo foi realizado com o propósito de verificar comparativamente os efeitos biomoduladores da terapia com LED e laser no reparo tecidual de feridas cutâneas dorsais de ratos portadores de diabetes induzidos por aloxana, com um único momento de irradiação, trinta minutos após o estabelecimento das lesões. Foram utilizados 36 animais, divididos em seis grupos experimentais. Três grupos foram compostos por ratos diabéticos e três por ratos com níveis de glicemia sanguínea considerados normais. Foram realizadas lesões dorsais circunferenciais, com área de $0,5 \text{ cm}^2$, em todos os animais. Em um grupo de ratos normais e em um de ratos diabéticos essas lesões não receberam nenhuma terapia coadjuvante, sendo considerados como controle. Nos grupos restantes, as lesões foram irradiadas com LED ($640 \pm 20 \text{ nm}$, 30 mW , 6 J/cm^2) ou laser (InGaAlP – 660 nm , 30 mW , 6 J/cm^2). Os animais foram acompanhados durante sete dias por avaliação clínica através de fotografias diárias das feridas. A avaliação macroscópica permitiu observar a dinâmica de contração das feridas. Ao final desse período os animais foram sacrificados e as feridas foram excisionadas. Os cortes histológicos confeccionados foram capturados e analisados histomorfologicamente e histomorfometricamente. Os animais dos grupos submetidos à fototerapia apresentaram evolução macroscópica do processo de reparo discretamente mais avançado que o grupo não tratado. A terapia com LED foi significativamente mais eficaz que a terapia com laser na redução do diâmetro das feridas no período de 72 horas pós-lesão. A luz coerente e não coerente produziram efeitos muito semelhantes no reparo das feridas no período de 168 horas pós-lesão, tanto na análise macroscópica, quanto microscópica. A análise microscópica revelou quantitativamente e qualitativamente uma melhor evolução no reparo tecidual para os grupos submetidos à fototerapia.

Palavras chave: Diabetes, LED, laser, cicatrização, feridas.

Comparative study between biomodulators effects of LED and Laser in cutaneous wounds of rats with the diabetes induced.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the noncontagious diseases more commonly found on the world population. The hyperglycemia associated to this disease results in several metabolic abnormalities that determine a delay on the process of cutaneous wound repair. The therapy that has shown to be promising for the treatment of these complications is the phototherapy, that despite of this fact, still does not have its biomodulators effects completely clarified, especially as physiological mechanisms involved and as its effects in the use of light emitted by diode (LED), recently inserted in this therapeutic modality. This study was executed in purpose of verifying comparatively the biomodulators effects of therapy with LED and laser for tissue repair of cutaneous dorsum wounds of rats with diabetes induced by aloxana, with only one moment of irradiation, thirty minutes after the establishment of the lesions. It was used 36 animals, divided in six experimental groups. Three groups were compound for diabetic rats and three for rats with levels of bloody glycemia considered normal. It was executed circumferential dorsum lesions, with an area of 0,5cm², in all the animals. In a group of normal rats and in one of diabetic rats these lesions did not receive any supporting therapy, being considered as control. In the groups left, the lesions were irradiated with LED (640 ± 20nm, 30 mw, 6J/cm²) or laser (InGaAlP – 660nm, 30mW, 6J/cm²). The animals were accompanied during seven days for clinical evaluation through daily wounds pictures. In the end of this period the animals were sacrificed and the wounds were removed. The histological cuts made were captured and analyzed histomorphologically and histomorphometrically. The groups of animals submitted to phototherapy showed a macroscopic evolution in the repair process discreetly more advanced than the untreated group. The therapy with LED was significantly more efficient than the therapy with laser for the reduction in the wounds diameter in the period of 72 hours post-lesion. The coherent and non coherent light produced very similar results in the period of 168 hours post-lesion, in both macroscopic and microscopic analysis. The microscopic analysis revealed quantitatively e qualitatively a bigger evolution for the tissue repair for the groups submitted to phototherapy.

Keywords: Diabetes, LED, laser, healing, wounds.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Componentes teciduais da pele.	22
Figura 2 - Esquema demonstrando a evolução do processo de reparo de uma ferida cutânea.	33
Figura 3 - Fórmula estrutural da aloxana.	39
Figura 4 - Esquema de uma cavidade laser.	43
Figura 5 - Esquema de um laser de diodo (GaAs).	44
Figura 6 - Possibilidades de interação da luz com os tecidos biológicos.	46
Figura 7 - Representação da junção e semicondutores para a construção de um LED.	48
Figura 8 - Distribuição espectral do LED e do Laser.	49
Figura 9 - Esquema de um LED (diodo emissor de luz).	49
Figura 10 - Distribuição dos grupos experimentais.	58
Figura 11 - Tricotomia e assepsia do dorso dos animais.	59
Figura 12 - Procedimento cirúrgico de estabelecimento das lesões dorsais.	60
Figura 13 - Equipamentos utilizados na fototerapia.	61
Figura 14 - Equipamento utilizado para a aferição da potência das fontes emissoras.	61
Figura 15 - Câmera digital Moticam® 2300 com acessórios.	63
Figura 16 - Figura representativa do diâmetro de Ferret obtido na elipse formada pelo contorno das feridas.	64
Figura 17 - Ilustração da forma de excisão dos tecidos para análise histológica.	65
Figura 18 - Fotografia do equipamento de captura digital.	66
Figura 19 - Ilustração da seqüência de comandos executados no programa ImageJ para quantificação dos parâmetros histológicos e análise histomorfométrica.	69
Figura 20 - Gráfico demonstrativo da evolução da glicemia sanguínea dos grupos experimentais durante o estudo em função do tempo. * = $p < 0,001$.	72
Figura 21 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas dos grupos experimentais durante o estudo em função do tempo.	73
Figura 22 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas do grupo controle durante o estudo em função do tempo.	74
Figura 23 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas do grupo diabético durante o estudo em função do tempo.	75
Figura 24 - Presença de crosta pós-cirurgia nos animais de diferentes grupos experimentais.	76
Figura 25 - Fotomicrografia da região mediana da ferida de animal do grupo controle submetido à fototerapia, indicando um processo de reparo com completa epitelização. (HE, 40X).	78
Figura 26 - Fotomicrografia da região mediana da ferida de animal do grupo diabético submetido à fototerapia, indicando um processo de reparo com epitelização	

incompleta e um infiltrado inflamatório maior se comparado ao grupo controle. (HE, 40X).	78
Figura 27 - Gráfico demonstrativo número de células inflamatórias da derme superficial e profunda.	79
Figura 28 - Fotomicrografia da derme superficial demonstrando o predomínio de células inflamatórias na região da lesão (seta). HE, 40X.	80
Figura 29 - Fotomicrografia da derme profunda com núcleos basófilos indicativos de células inflamatórias (setas). HE, 200X.	80
Figura 30 - Gráfico demonstrativo número de vasos sanguíneos da derme superficial e profunda.	81
Figura 31 - Fotomicrografia da derme destacando a presença de vasos sanguíneos (setas). HE, 100X.	81
Figura 32 - Gráfico demonstrativo do número de fibroblastos encontrados na derme superficial e profunda.	82
Figura 33 - Fotomicrografia da derme destacando a presença de fibroblastos (setas). HE, 200X.	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais tipos de colágeno. (CONTRAN <i>et al.</i> , 2000).	23
Tabela 2 - Análise compartimentada do uso da fototerapia no reparo de feridas cutâneas.	51
Tabela 3 - Evolução da glicemia sanguínea e do peso dos animais durante o período de indução do diabetes.	56
Tabela 4 - Distribuição dos grupos experimentais.	58
Tabela 5 - Demonstração dos parâmetros avaliados na análise histomorfológica propostos por (YU <i>et al.</i> , 1997).	67
Tabela 6 - Evolução do peso dos animais durante o estudo.	71
Tabela 7 - Evolução da glicemia sanguínea dos animais durante o estudo.	72
Tabela 8 - Evolução do diâmetro das feridas nos grupos experimentais durante o estudo.	73
Tabela 9 - Evolução do diâmetro das feridas nos grupos experimentais durante o estudo.	76
Tabela 10 - Representação numérica da análise histomorfológica dos vários grupos estudados.	

Listas de Abreviaturas e Siglas

AGEs - *Advanced Glycosylation End* (produtos terminais de glicosilação avançada irreversíveis nos tecidos)

InGaAlP – Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio

ANOVA – Análise da variância

GaAs – Arseneto de Gálio

GaAlAs - Arseneto de Gálio-Alumínio

ATP – Adenosina Trifosfato

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX – Ciclooxygenase

DE – Densidade de energia

DM – *Diabetes mellitus*

EGF – *Epidermal Growth Factor* (fator de crescimento epidérmico)

HE – Hematoxilina e Eosina

He-Ne – Helio-Neônio

IP&D – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Laser - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (luz amplificada por emissão estimulada de radiação)

LED – *Light Emitting Diode* (luz emitida por diodo)

LLLT – Low Level Laser Therapy

PDGF – *Platelet Derived Growth Factor* (fator de crescimento derivado de plaquetas)

PGE – Prostaglandina

pH – Potencial hidrogênio nico

SiO₂ – Dióxido de Silício

STZ – *Streptozotocin* (estreptozotocina)

TGF-β – *Transforming Growth Factor Beta* (fator de crescimento transformante beta)

TLBP – Terapia com laser em baixa potência

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

UV – Ultravioleta

YAG – *Yttrium Aluminum Garnet* (Ítrio Alumínio Granada)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A pele e o sistema tegumentar	20
2.1.1 Epiderme	20
2.1.2 Derme	21
2.2 O processo de reparo tecidual	23
2.2.1 A fase inflamatória ou exsudativa	24
2.2.2 A fase proliferativa	27
2.2.3 A fase de maturação e remodelamento da matriz extracelular	31
2.3 Feridas	33
2.3.1 Classificação	33
2.3.2 Tipos de cicatrização	34
2.3.3 Tratamentos	35
2.4 Diabetes mellitus	36
2.4.1 Fármacos hiperglicemiantes	38
2.4.2 Diabetes e reparo tecidual	40
2.5 Uso da luz coerente e da luz não coerente na biomodulação tecidual	41
2.5.1 Luz coerente e não coerente	41
2.5.2 Princípios do sistema laser	42
2.5.3 Propriedades e comportamento da radiação laser	44
2.5.4 Princípios do sistema LED	47
2.5.5 Propriedades e comportamento da radiação emitida pelo LED	48
2.6 Emprego da fototerapia no reparo de feridas cutâneas	50
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 METODOLOGIA	54
4.1 Aspectos éticos	55
4.2 Modelo experimental	55
4.3 Indução do diabetes experimental	55
4.3.1 Determinação dos níveis de glicemia sanguínea	56
4.4 Distribuição dos grupos experimentais	57
4.5 Procedimento cirúrgico	58
4.6 Fototerapia	60
4.6.1 Equipamentos utilizados	60
4.6.2 Fototerapia nos grupos LASER (LASER controle e LASER diabético)	61
4.6.3 Fototerapia nos grupos LED (LED controle e LED diabético)	62

4.7 Coleta de dados para a análise macroscópica	62
4.8 Coleta de dados para a análise microscópica	65
4.8.1 Análise histomorfológica	66
4.8.2 Análise histomorfométrica	68
4.9 Análise estatística	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Evolução clínica e laboratorial dos animais	71
5.2 Evolução do reparo das feridas – análise macroscópica	72
5.2.1 Diâmetro das feridas	72
5.2.2 Características da crosta	75
5.3 Evolução do reparo das feridas – análise histomorfológica	76
5.4 Evolução do reparo das feridas – análise histomorfométrica	78
5.4.1 Contagem de células inflamatórias	79
5.4.2 Contagem de vasos sanguíneos	80
5.4.3 Contagem de fibroblastos	82
6 DISCUSSÃO	84
6.1 Ensaio biológicos	85
6.2 Evolução do reparo das feridas	86
7 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	107
APÊNDICE	109

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) ou diabetes é uma doença metabólica caracterizada pela ausência total da insulina ou mesmo pela resposta deficiente à ação desse hormônio. Cerca de 3% da população mundial, ou seja, aproximadamente 100 milhões de pessoas são acometidos pela doença. Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi estimado em 64 milhões para o ano 2025 (KING *et al.*, 1998).

O diabetes causa uma série de complicações sistêmicas determinando que a morbidade associada e os distúrbios ocasionados, como a microangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia, sejam alvo constante de inúmeras pesquisas (CONTRAN *et al.* 2000).

Há quase meio século diversos pesquisadores vêm estudando os problemas de cicatrização de feridas apresentados pelos portadores de diabetes, principalmente os que acontecem na fase inflamatória do reparo, que é caracterizada por eventos vasculares e celulares e que, neste caso, apresentam-se alterados (GRANDINI, 1978; GOODSON; HUNT, 1979).

Esses estudos propiciaram o desenvolvimento de abordagens terapêuticas cada vez mais eficientes que auxiliaram no processo de reparo tecidual com a minimização da ação dos fatores que o retardam ou dificultam. Dentre essas abordagens, a fototerapia, que consiste na utilização terapêutica da luz, tem apresentado bons resultados como meio coadjuvante do tratamento das complicações associadas ao diabetes (MIRZAEI *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; MEIRELES *et al.*, 2008; SOBANKO; ALSTER, 2008).

A fototerapia teve sua origem relacionada à aplicação terapêutica do laser por Mester e colaboradores (VINCK *et al.*, 2003; ABRAMOVITS *et al.*, 2005) e desde então, o laser operando em baixa potência vem constantemente ganhando espaço na terapêutica médica devido à baixa energia utilizada, ausência de potencial fototérmico e a comprovada eficácia na melhora estrutural da cicatrização (LOPES *et al.*, 2006).

Contudo, a utilização do laser na fototerapia possui como fator limitante o alto custo do equipamento e determina que novas fontes de luz venham sendo introduzidas nessa modalidade terapêutica. O destaque é o emprego da luz emitida por diodo (LED) que, apesar dos estudos incipientes, também tem apresentado bons resultados a um baixo custo (WHELAN *et al.*, 2001; VINCK *et al.*, 2003; WHELAN *et al.*, 2003; AL-WATBAN; ANDRESS, 2006).

Desta forma, a fototerapia merece destaque como uma modalidade terapêutica eficaz na minimização dos efeitos adversos ocasionados pelo diabetes e o emprego de fontes de luz

alternativas, como o LED, por ainda não possuir estudos conclusivos, merece a atenção do meio científico.

No presente trabalho é proposto um estudo experimental e comparativo dos efeitos biomoduladores da fototerapia com a utilização do laser em baixa potência e do LED no reparo de feridas cutâneas de ratos portadores de diabetes induzido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pele e o sistema tegumentar

A pele constitui o maior órgão do corpo humano e é onde ocorrem interações celulares e moleculares que comandam numerosas respostas cruciais ao meio ambiente (CONTRAN *et al.*, 2000). No ser humano, esse órgão constitui cerca de 16% do peso corporal e juntamente com os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, pelos e unhas, formam o tegumento ou sistema tegumentar (CORMARCK, 1991; STEVENS; LOWE, 1997).

A pele é formada de duas camadas: uma externa formada de tecido epitelial, e denominada de epiderme e outra mais interna, basicamente formada de tecido conjuntivo, denominada de derme. A epiderme tem sua origem embriológica no ectoderma e a derme é derivada do mesoderma.

Abaixo da pele encontra-se a fáscia superficial ou a hipoderme, constituída de um tecido conjuntivo frouxo contendo quantidades variáveis de gordura. Em indivíduos obesos ou que vivem em clima frio essa camada é espessa e forma o panículo adiposo (GARDNER; HIATT, 2003).

As funções da pele no organismo são muitas. Além de cobrir os tecidos moles subjacentes, protege os mesmos contra lesões, invasão bacteriana e dessecação, regula a temperatura corporal, recebe sensações contínuas do meio ambiente (tato, temperatura, pressão e dor), realiza excreção através das glândulas anexas e absorve a radiação ultravioleta (UV) solar para a síntese de vitamina D (STEVENS; LOWE, 1997; GARDNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.1.1 Epiderme

A epiderme é constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, podendo aparecer mais fina revestindo a maior parte do corpo humano, onde varia de 0,07 a 0,12 mm, e mais espessa em alguns locais, como nos cotovelos, planta dos pés e palma das mãos onde pode chegar a 1,4 mm. Neste caso a pele é denominada de pele espessa e apresenta um tecido epitelial com cinco camadas de células muito próximas, em íntimo contato, denominadas de queratinócitos e unidas entre si por um complexo juncional e por desmossomos (GARDNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As camadas ou estratos celulares da epiderme recebem sua denominação de acordo com a forma e a posição das células que as compõe.

No limite com a derme subjacente, em contato com a lâmina basal e presa a ela por hemidesmossomos, localiza-se a camada basal, rica em células indiferenciadas e em alto grau de proliferação pela atividade mitótica intensa. Na seqüência, em direção à superfície livre, encontra-se a camada espinhosa, que possui esse nome devido à presença de pequenos prolongamentos citoplasmáticos com tonofibrilas associadas aos desmossomos, que mantêm a coesão entre as células aumentando a resistência ao atrito. A camada basal, juntamente com a espinhosa, forma a camada de Malpighi e refere-se às camadas da epiderme com células mitoticamente ativas.

Na região apical da epiderme encontram-se, em seqüência, as camadas granulosa, lúcida e córnea. Esta última fica em contato com a superfície epitelial livre, com espessura variável e é composta por células pavimentosas e anucleadas, cujos citoplasmas mostram-se repletos de queratina. Essas características determinam a nomenclatura de pavimentoso estratificado e queratinizado ao epitélio que forma a epiderme (GARDNER; HIATT, 2003).

Na epiderme, além dos queratinócitos, encontram-se outros três grupos de células, denominadas de não queratinócitos. São os melanócitos, responsáveis pela produção da proteína melanina (pigmento castanho que funciona como filtro endógeno contra a radiação ultravioleta); as células de Langerhans, dendríticas e com função de captar e processar sinais antigênicos, comunicando as informações para as células linfóides; e as células de Merkel, que formam uniões sinápticas com as terminações nervosas periféricas, funcionando como receptores táteis (GARDNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.1.2 Derme

A derme esta situada abaixo da epiderme e é formada por tecido conjuntivo cujas funções principais são as de sustentação e nutrição ao tecido epitelial que compõe a epiderme. A derme, ao contrário da epiderme, possui muitos vasos sanguíneos e linfáticos, além de terminações nervosas. Na derme localizam-se os anexos epidérmicos. Apêndices como unhas, cabelos e glândulas são ligados a ela.

A junção da derme com a epiderme (junção dermo-epidérmica) é estabelecida através da lâmina basal. Nesta região a derme emite saliências em direção à epiderme, denominadas de papilas dérmicas, com função de melhorar a união do conjunto e impedir sua separação em caso de atrito.

Existem duas camadas histológicas na derme. Uma mais próxima à epiderme, denominada de camada papilar e outra mais próxima ao tecido subcutâneo ou hipoderme, denominada camada reticular. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo e a reticular de tecido conjuntivo denso, rico em fibras elásticas do sistema elaurínico e oxitalânico (COTRAN *et al.*, 2000; GARDNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

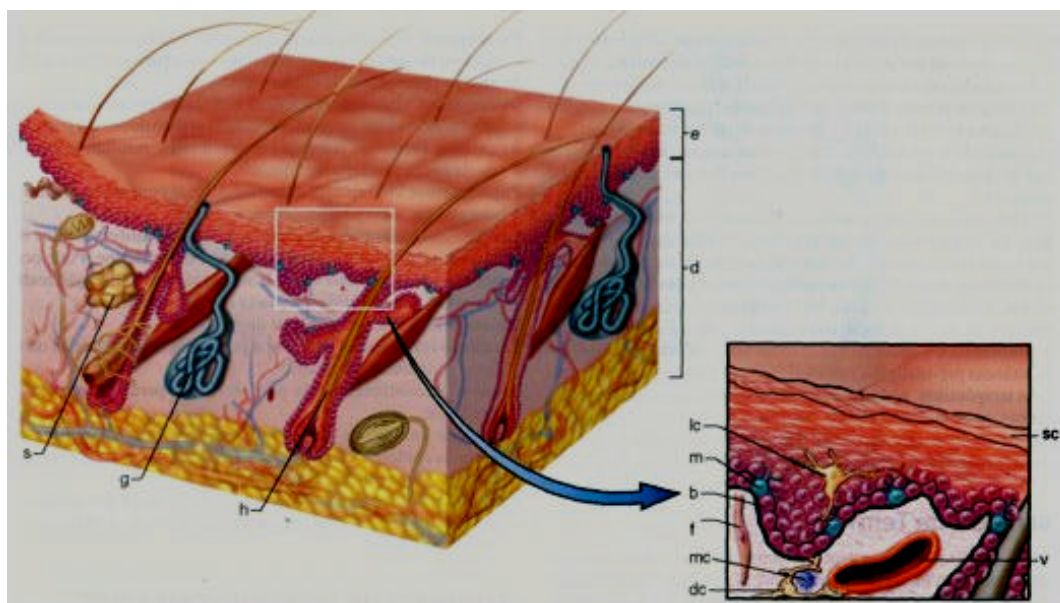


Figura 1 - Componentes teciduais da pele.

Fonte: COTRAN *et al.*, (2000).

(e) epiderme, (d) derme, (b) células da camada basal, (m) melanócitos, (lc) células de Langerhans, (v) capilares sanguíneos, (f) fibroblastos, (mc) mastócitos, (dc) dendrócitos, (sc) estrato córneo, (s, g e h) anexos cutâneos.

Os fibroblastos e fibrócitos, células secretoras do tecido conjuntivo, estão presentes na derme produzindo fibras colágenas, elásticas e reticulares, além matriz extracelular (substância fundamental) composta de macromoléculas (proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas) e água.

As fibras nervosas da pele são do tipo não mielinizado e atuam sobre o fluxo vascular e sobre os anexos cutâneos. Nela também é encontrado um sistema aferente de inervação mista e numerosas terminações nervosas livres, responsáveis pelas sensações de dor, temperatura, pressão e tato. Dentre estas terminações sensitivas encontram-se os corpúsculos de Pacini e de Meissner (HIB, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O colágeno é o principal tipo de proteína fibrilar insolúvel encontrado na matriz extracelular do tecido conjuntivo da derme. Existem pelo menos quatorze tipos de colágeno, sendo que os do tipo I, II e III são os mais abundantes e formadores de estruturas fibrilares ou similares. O tipo IV, forma retículos bidimensionais e é o principal componente na lâmina

basal. A Tabela 1 mostra os principais tipos de colágeno, suas características e suas distribuições no organismo humano.

Tabela 1 - Principais tipos de colágeno. (CONTRAN *et al.*, 2000).

Tipo	Características	Distribuição
I	Feixes de fibras em bandas com elevada força elástica	Pele (80%), osso (90%), tendões, a maioria de outros órgãos
II	Fibras delgadas; proteína estrutural	Cartilagem (50%), humor vítreo
III	Fibrilas delgadas: elásticas	Vasos sanguíneos, útero, pele (10%)
IV	Amorfo	Todas as membranas basais
V	Amorfo/fibrilas finas	2-5% dos tecidos intersticiais, vasos sanguíneos
VI	Amorfo/fibrilas finas	Tecidos intersticiais
VII	Filamento de ancoragem	Junção dermoepidérmica
VIII	Provavelmente amorfo	Membrana do endotélio-Descemet
IX	Possível papel na maturação	Cartilagem

O entendimento da reparação de lesões (feridas) cutâneas, por envolver complexos fenômenos celulares e outros eventos que interagem entre si, é fundamental para o conhecimento do comportamento da pele, cuja maior função é servir de barreira de proteção contra o meio extracorpóreo (CORMARCK, 1991; ABLA; ISHIZUKA, 1995).

2.2 O processo de reparo tecidual

A capacidade do organismo vivo de substituir células lesadas ou mortas e promover o reparo dos tecidos, após o processo inflamatório, é fundamental para a sobrevivência. Nesse sentido, o processo de reparo está presente para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido submetido à lesão (CONTRAN *et al.*, 2000).

Este fenômeno culmina com a regeneração e recomposição da atividade funcional do tecido e a substituição das células lesadas por células do mesmo tipo, às vezes sem deixar vestígio residual da lesão anterior. Pode ocorrer também uma substituição por tecido conjuntivo num processo denominado de fibroplasia ou fibrose com a cicatrização e o restabelecimento da homeostasia (SANTOS, 2000). O processo é dinâmico e compreende várias etapas que incluem a inflamação, proliferação celular e síntese do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular (SAHL; CLEVER, 1994; CONTRAN *et al.*, 2000).

No processo de reparo, enquanto o agente agressor é destruído, uma sequência de eventos ocorre no intuito de substituir o tecido lesado através da regeneração de células parenquimatosas nativas ou pela proliferação de um tecido cicatricial ou mesmo pela associação destes dois eventos (RUBIN; FARBER, 2002; STEVENS; LOWE, 2002).

O reparo completo dos tecidos alterna sucessivas reações anabólicas e catabólicas, envolvendo os leucócitos como protagonistas com sua conhecida atividade imune e reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio (BALBINO *et al.*, 2005).

A regeneração e a cicatrização devem ser consideradas eventos distintos. Na regeneração a reposição tecidual é feita por células do mesmo tipo das que foram perdidas e, se o estroma estiver pouco alterado, há reparação completa da lesão. Já a cicatrização consiste na substituição de um tecido lesado por um tecido conjuntivo próprio: a cicatriz (BOGLIOLO, 1978).

A reparação tecidual pode ser dividida em três fases: inflamatória ou exsudativa, fase proliferativa ou fibroblástica e fase de maturação ou remodelação (BLANES, 2007). Clark (1993) denomina essas fases de inflamação, formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação tecidual.

Essas fases são complexas, altamente coordenadas, dinâmicas e sobrepostas, com eventos que finalizam uma fase e estimulam o início de outra, determinando as características da cicatriz (SILVA *et al.*, 2007).

2.2.1 A fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória envolve um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este mecanismo é composto por vários fenômenos complexos, que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata, envolvendo eventos celulares com uma complexa interação entre células inflamatórias e células vasculares. A inflamação pode ser considerada uma resposta orgânica inespecífica à lesão tecidual, pois independe se os agentes causadores sejam físicos, químicos ou biológicos (BOGLIOLO, 1978; CONTRAN *et al.*, 2000).

Em resposta à lesão ocasionada, os tecidos vascularizados desencadeiam o processo inflamatório. Essa resposta está estreitamente interligada ao processo de reparação. Para Contran *et al.* (2000) “[...]a inflamação serve para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo, mas, por sua vez, põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, cicatrizam e reconstituem o tecido danificado[...]” (pág. 44).

A seqüência de eventos inicia com a prevenção da perda de sangue originado da ruptura dos vasos sanguíneos durante a agressão. É desencadeada a agregação plaquetária com subsequente ativação da cascata de coagulação, resultando na formação de um trombo que

limita a perda sanguínea. As plaquetas extravasadas aderem ao colágeno do espaço extravascular, usando receptores específicos de membrana, aderindo-se as proteínas da matriz extracelular. Esse contato com o colágeno fibrilar ativa as plaquetas induzindo as proteínas adesivas IIb/IIIa, específicas da membrana plaquetária, e da integrina β , favorecendo a liberação do conteúdo de seus grânulos: fibrinogênio, fibronectina, fator de Von Willebrand e trombospondina.

Em seguida, as moléculas adicionais da matriz extracelular juntam-se à massa agregada de plaquetas e fibrina e essa interação estabelece e fortalece a matriz em formação. O fibrinogênio do plasma que flui do sistema vascular lesado, bem como o fibrinogênio liberado pelas plaquetas, são induzidos a polimerizar através da via intrínseca e extrínseca da coagulação.

Esses eventos determinam que o gel extravascular, provisoriamente localizado na cavidade criada pela lesão, seja composto de material proveniente do sangue e por uma matriz extracelular fraca formada por fibrinogênio, fibronectina e fator de Von Willebrand. Boa parte dessas substâncias tem origem nas plaquetas ativadas que estão capturadas no interior do trombo (KNIGHTON *et al.*, 1981).

A principal característica da fase inflamatória ou exsudativa é a liberação de mediadores químicos (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxanos, linfocinas, interleucina 1 e 2). Dentre outras ações, esses mediadores atuam nos receptores das células da microcirculação e nos leucócitos produzindo o aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício. Isso se deve à retração das células endoteliais, que perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade vascular, permitindo a passagem de plasma, elementos sanguíneos, eritrócitos e leucócitos através do fenômeno da diapedese (BOGLIOLO, 1978).

A vasodilatação, com extravasamento de elementos para o exterior do vaso, forma o exsudato e traduz-se clinicamente por tumor, calor, rubor e dor, cuja intensidade está relacionada com o tipo e grau de agressão. Juntamente a essa resposta vascular, nesta fase, existe uma importante resposta celular: os neutrófilos digerem bactérias e tecidos desvitalizados, auxiliados pelos monócitos que transformam-se em macrófagos celulares. Também ocorre a liberação do fator de crescimento pelas células epidérmicas e plaquetas (SILVA *et al.*, 2007).

A inflamação divide-se em padrões agudo e crônico. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, de minutos a várias horas ou poucos dias. Suas principais características são exsudação de líquido com proteínas plasmáticas (edema) e migração leucocitária

(predominantemente de neutrófilos). É uma resposta imediata e precoce ao agente nocivo, independente da natureza do agressor ou da variedade de estímulos e com resposta muito similar (SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 2000). Este processo se caracteriza por três eventos principais: alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo, mudanças estruturais na microvascularização, permitindo a saída de proteínas plasmáticas e leucócitos da circulação e emigração de leucócitos da microcirculação com acumulação nos focos de agressão (MEDEIROS *et al.*, 1995).

A reação inflamatória aguda também é caracterizada pelos sinais cardeais: calor, rubor, dor, edema e perda de função, resultantes do aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, exsudação leucocitária, liberação de agentes álgicos e efeitos induzidos pelos mediadores químicos presentes.

Os estímulos necessários para a indução da reação inflamatória aguda são fornecidos pelos eventos subseqüentes à lesão vascular. O fator de Hageman ativado, molécula do sistema de coagulação derivada do plasma, inicia o sistema das cininas que culminam na liberação da bradicinina, um peptídeo ativo. Além das suas propriedades vasoativas, a bradicinina induz a produção de metabólitos araquidônicos, potentes moléculas pró-inflamatórias. O sistema fibrinolítico, responsável pela degradação da fibrina, é composto por agentes quimiotáticos para neutrófilos. Os componentes do sistema complemento clivados também participam da indução primária da inflamação através da produção de anafilatoxinas que levam a degranulação de mastócitos e estes, somados à matriz extracelular recém-formada, fornecem importantes substâncias quimiotáticas para os leucócitos. Os neutrófilos e macrófagos, por sua vez, respondem rapidamente a essa nova abundante fonte de agentes quimiotáticos e a esses estímulos ativadores. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar ao local da lesão com função de fagocitar e destruir qualquer bactéria presente na área (KNIGHTON *et al.*, 1981).

A inflamação crônica apresenta duração maior e está associada histologicamente com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de tecido conjuntivo e de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (CONTRAN *et al.*, 2000).

Os macrófagos derivados de monócitos acumulam-se entre dois e cinco dias após a lesão, auxiliando os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, restos teciduais, e removendo os neutrófilos exauridos. É importante ressaltar que os macrófagos liberam diversos fatores de crescimento e citocinas, induzidos por sinais exclusivamente governados pelo microambiente local, que são importantes na manutenção da reação inflamatória e na iniciação do processo de cura da ferida.

Com o comprometimento da microvasculatura no local lesado, e com a formação de um trombo avascular, o tecido situado no centro da ferida fica relativamente isquêmico. A presença de neutrófilos e macrófagos ativados nessa área aumenta a demanda metabólica pelo oxigênio, fazendo sua tensão cair e, em consequência, o pH aumentar no espaço ocupado pela lesão. Essa combinação de hipóxia, acidez e concentração de lactato ativa os macrófagos da ferida a enviar sinais de perigo, que se manifestam pela elaboração de fatores de crescimento. Dentro da ferida, a tensão de oxigênio está próxima do zero e durante este período observa-se a angiogênese, que pode ser resultante dos macrófagos que migram ao interior da ferida tornando-se anóxicos, o que estimula o crescimento dos capilares (KNIGHTON *et al.*, 1981).

Os principais fatores de crescimento ligados à migração e à coordenação dos fibroblastos e macrófagos para a cicatriz são os fatores de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Os fatores de crescimento derivados dos macrófagos são coletivamente responsáveis pela seqüência de alterações que caracterizam a fase seguinte do reparo da ferida. (HUYBRECHTS-GODIN *et al.*, 1979; VINCK *et al.*, 2003).

2.2.2 A fase proliferativa

A fase é denominada de proliferativa, possui duração de 12 a 14 dias, e caracteriza-se pelo reparo do tecido conjuntivo com formação de tecido de granulação e consecutiva repitelização. O processo de reparo começa logo no início da inflamação e, se em torno de 24 horas após a lesão não houver resolução, os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a proliferar para formar um tipo especial de tecido que caracteriza a cicatrização e é denominado de tecido de granulação. Esse apresenta aspectos histológicos característicos, que são a formação de novos e pequenos vasos sanguíneos e proliferação de fibroblastos (RUBIN; FARBER, 2002; STEVENS; LOWE, 2002).

No processo de reparo, por volta do segundo ou terceiro dia após o trauma, os fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da lesão e induzidos a sintetizar essa proteína, num processo seletivo conhecido como fibroplasia. O fibrinogênio do exsudato inflamatório se transforma em fibrina formando uma rede, onde os fibroblastos ficam aderidos, se multiplicam e começam a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial.

Concomitante à fibroplasia, ocorre intensa proliferação vascular. Entra em ação também o miofibroblasto que é uma célula presente no tecido de granulação e, pela sua capacidade

contrátil, reduz a área da lesão, facilitando a repitelização. Isso ocorre devido a alguns fibroblastos diferenciarem-se em células contráteis denominadas miofibroblastos. Os fibroblastos no tecido de granulação começam a exibir características funcionais similares às células dos músculos lisos (GABBIANI *et al.*, 1971).

A atividade mitótica dos fibroblastos praticamente desaparece em torno do 15º dia, quando passam a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação, produzindo componentes da substância fundamental e colágeno (BLANES, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento, por uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos e vasos recém-formados e exsudativos. O tecido de granulação começa a ser formado por volta do quarto dia após a lesão e nesta etapa, os novos fibroblastos acumulados misturam-se a neoformações de capilares.

O principal componente do tecido de granulação são os fibroblastos, células fibrilares alongadas com núcleos hipercromáticos de aspecto fusiforme e freqüentes figuras de mitose, agrupados formando feixes ou fascículos. Os capilares recém-formados apresentam-se em fileiras paralelas, perpendiculares à superfície da ferida. O tecido é edematoso e caracteriza-se por muitos espaços vazios, em decorrência da imaturidade desses novos capilares, que tendem a exsudar fluidos. Quando observadas a olho nu, as superfícies parecem conter muitos grânulos vermelhos, revelando a extremidade romba das alças dos novos capilares, que avançam perpendicularmente e em direção à superfície. Tipicamente o tecido tem uma cor vermelho-escura e sangra com muita facilidade (GUIDUGLI NETO, 1987).

A matriz extracelular, formada por constituintes plasmáticos, plaquetas, macrófagos e fibroblastos migratórios, determinam um meio de aderência, migração e orientação das células que irão formar o tecido de granulação em desenvolvimento. A anatomia da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação celular. A neovascularização é essencial nesse estágio, porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988).

Uma contínua modificação nos constituintes da matriz extracelular ocorre durante o processo de reparo da ferida. Inicialmente, a matriz é composta de proteínas derivadas das plaquetas e do plasma; com a migração dos macrófagos até a ferida e mais tarde com a formação do tecido de granulação, onde os componentes da matriz extracelular são produzidos pelas próprias células *in situ*. A combinação dos fibroblastos, que depositam grandes quantidades de fibronectina, e o ácido hialurônico cria um microambiente eficiente para a movimentação das células e proporcionam a contínua fixação, desalojamento e fixação

celular à matriz da ferida. A fibronectina juntamente com o ácido hialurônico são os componentes predominantes da matriz durante as primeiras fases do reparo de uma ferida e, à medida que o processo de reparo evolui, ocorre diminuição da concentração do ácido hialurônico e aumento a concentração dos proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa alteração na composição dos proteoglicanos também favorece a fixação e imobilidade das células.

Quando cessa o movimento da matriz, as células diferenciam-se em fenótipos mais maduros. As células endoteliais maturam e resultam em capilares funcionais para células de revestimento e os fibroblastos dão início à formação do colágeno. À medida que a ferida avança em seu processo de maturação, os proteoglicanos e a fibronectina são substituídos pelo colágeno, que se torna o principal componente estrutural da cicatriz.

Os fibroblastos passam por várias alterações fenotípicas, tornando-se células migratórias, replicativas e imaturas, até células extremamente produtoras de colágeno. Nesse caso, o citoplasma torna-se mais volumoso e contém um abundante retículo endoplasmático rugoso, característico de uma célula ativamente sintetizadora de proteínas.

O colágeno é a proteína mais abundante nos organismos animais e sua produção envolve diversos eventos. Cada molécula de colágeno compõe-se de três cadeias polipeptídicas enroladas umas as outras, em forma de hélice. Os muitos tipos de colágenos encontrados nos tecidos são explicados pela composição bioquímica das cadeias individuais e a combinação dessas cadeias formadoras da molécula de colágeno. Entretanto, cada molécula de colágeno é similar, visto que as cadeias peptídicas possuem o aminoácido glicina em cada terceira posição, com prolina e lisina freqüentemente nas outras posições. As cadeias polipeptídicas são manufaturadas no citoplasma do fibroblasto, especificamente nos ribossomos dessa célula. A partir dessas organelas, as cadeias passam para as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, onde as três cadeias são montadas numa hélice. Um aspecto crítico para a formação da hélice é a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina, para a formação, respectivamente, de hidroxiprolina e hidroxilisina, sendo necessária para a estabilidade da hélice, e subsequente liberação da célula. Em seguida à formação da hélice, a molécula passa a ser conhecida como pró-colágeno. Uma vez fora da célula, a molécula de pró-colágeno é clivada de seus domínios não helicais terminais por pró-colágeno-peptidases específicas, sendo então designada tropocolágeno. Sem os domínios não helicais terminais, essas moléculas podem polimerizar, formando fibrilas que comporão as fibras de colágeno, ou seja, a coluna estrutural do colágeno maduro. Os tipos de I a III de colágeno são fibrilares, os

tipos IV e V não sofrem clivagem proteolítica dos domínios terminais do pró-colágeno, que impedem a polimerização para formação de fibrilas (GABBIANI *et al.*, 1971).

Embora a baixa tensão de oxigênio na ferida seja o estímulo para a elaboração de fatores vitais do crescimento pelos macrófagos, a hipóxia é prejudicial para vários processos fisiológicos normais, em particular para a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Há necessidade de oxigênio para hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas montadas no citoplasma dessas células. Sem oxigênio suficiente, a molécula helicoidal de pró-colágeno não se forma, e nem é subsequentemente liberada no espaço extracelular. Além do oxigênio, também é preciso vitamina C para que essas hidroxilações ocorram. O suprimento de oxigênio na ferida é derivado da nova vascularização sanguínea estabelecida.

No processo de reparo da ferida ocorre um equilíbrio na permeabilidade dos gases, em que a hipóxia impulsiona a migração celular e o início da angiogênese. A partir daí, o organismo eleva os níveis de oxigênio, suprimindo as demandas metabólicas associadas mais tarde à síntese de colágeno. Na pele, imediatamente depois do estabelecimento de uma lesão, inicia-se o processo de cicatrização com diminuição progressiva dessa área lesada. O fato deve-se principalmente ao movimento centrípeto de suas bordas, sobretudo em resposta à ação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação e também pela retração das margens da lesão, causada pela ação centrífuga das fibras elásticas da região (MCGRATH; SIMON, 1983). Esse fenômeno é denominado de contração da ferida e sua conclusão pode levar meses e muitas vezes não se completar (FALCÃO *et al.*, 2001). Esta contração é garantida por dois mecanismos distintos: em consequência do ressecamento da crosta que se dá nos primeiros dias e pela ação dos miofibroblastos (GABBIANI *et al.*, 1971).

Em um curto espaço de tempo, o fechamento de uma ferida por processo de contração de suas margens é considerado insuficiente por ainda restar uma área situada dentro do perímetro correspondente, denominada de área de epitelização. No espaço de tempo referido, a cicatrização se dará como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (MCGRATH; SIMON, 1983).

O início da repitelização pela migração das células epiteliais ocorre algumas horas após o estabelecimento de alguma lesão cutânea. Essas células epiteliais são provenientes das margens das feridas, estimuladas pelo fator de crescimento epidérmico e fator das margens livres e, durante a migração, sofrem alterações, retraindo tonofilamentos intracelulares, dissolvendo desmossomas e formando filamentos de actina periféricos. Tais alterações liberam as células da membrana basal subjacente e das células epiteliais adjacentes, dando-

lhes a capacidade de movimentar-se lateralmente. As células migram sobre uma matriz extracelular provisória, em que uma significativa proporção de fibronectina é produzida pelas próprias células epiteliais migratórias e essa migração é mais evidente e rápida quando a superfície da ferida está umedecida e bem oxigenada. Quando uma crosta está recobrindo a ferida, esse processo migratório sofre atraso. Quando a repitelização é completada em toda a superfície da ferida cutânea, as células epiteliais voltam ao seu fenótipo normal, reconstituindo a membrana basal pelo novo epitélio, e restabelecendo os desmossomas e hemidesmossomas. Semelhante à síntese do colágeno, a repitelização é favorecida pela presença de oxigênio, fornecido pela angiogênese e pela exposição ao ar.

Ao final da fase proliferativa o leito da ferida está preenchido com tecido de granulação, possui uma rede de capilares neoformados que perpassam o leito da ferida e a rede linfática começa a regenerar. Lentamente o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas e começa a ter aparência de cicatriz, por causa do acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI NETO, 1987).

2.2.3 A fase de maturação e remodelamento da matriz extracelular

A fase de maturação ou remodelamento da matriz extracelular pode ser considerada o final do processo de reparo de uma ferida. Esse processo é lento, podendo levar meses ou anos. Essa fase se caracteriza pela ocorrência de dois eventos importantes: a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial.

É nessa fase que a cicatriz adquire sua maior tensão e o colágeno adquire maior força tênsil e empalidece, mas mesmo assim uma cicatriz cutânea completamente madura tem apenas 70% de sua resistência normal (ABLA; ISHIZUKA, 1995).

A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e mantém-se por meses após a repitelização. As collagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas dão direção correta às fibras colágenas difusas. Há diminuição de todos os elementos celulares, inclusive fibroblastos, bem como de elementos do tecido conjuntivo e a regressão endotelial ocorre através da diminuição progressiva de vasos neoformados. Clinicamente a cicatriz se torna menos espessa, mudando de cor (BLANES, 2007).

A resistência de uma cicatriz conjuntiva fibrosa pode ser atribuída a dois fatores: o acúmulo da deposição de colágeno e à remodelagem das fibrilas dessa proteína, onde podem ser formados feixes maiores, com maior número de ligações covalentes transversais entre as fibrilas que a compõe.

O processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e reorientação das fibrilas de colágeno. É atingido um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno, de modo que, embora a produção de colágeno continue elevada numa ferida em reparo, essa estrutura não cresce em tamanho. O colágeno é depositado em um “molde” de fibronectina de maneira aleatória; dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Num processo de remodelamento essas fibras de colágeno são digeridas pela enzima collagenase e novamente formadas em arranjos similares aos ocorrentes no tecido normal e adjacente à lesão. A collagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida, como leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Assim, os feixes de fibras colágenas tornam-se gradativamente mais espessos, resultando em uma configuração regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas a qual o tecido está submetido durante a atividade normal (CLARK, 1985).

No início do processo de reparo, o tropocolágeno sofre polimerização fora da célula, formando fibrilas pelo uso de forças eletrostáticas fracas e pontes de hidrogênio. Contudo, sob o controle de enzima lisiloxidase, lisinas, hidroxilisinas e lisinas glicosiladas situadas na molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos. Em seguida, os aldeídos formam ligações com outros grupos aldeídos, ou com resíduos de lisina não oxidada. Essas ligações cruzadas formam-se entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas, de modo que se formam fibras maiores de colágeno, compostas por muitas fibrilas. A formação dessas fibras maiores de colágeno, apresentando uma quantidade significativa de ligações cruzadas entre as fibrilas, explica a grande resistência tênsil inerente às cicatrizes.

Embora a síntese do colágeno seja dependente do oxigênio, sua degradação pela collagenase é independente da presença desse gás. Sendo assim, uma cicatriz de um ferimento sem uma vascularização e oxigenação adequadas tornar-se-á cada vez mais frágil, em decorrência dos processos catabólicos associados à lise do colágeno, sem que ocorra uma síntese concomitante. A cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrosa acrescida de fibras colágenas. Observa-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais, e os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação, presumindo que possam estar ligados a fatores de crescimento (TODD *et al.*, 1991).

A figura 2 mostra, de forma esquematizada, os principais eventos que ocorrem no processo de reparo tecidual em uma ferida cutânea com base nos dados supracitados.

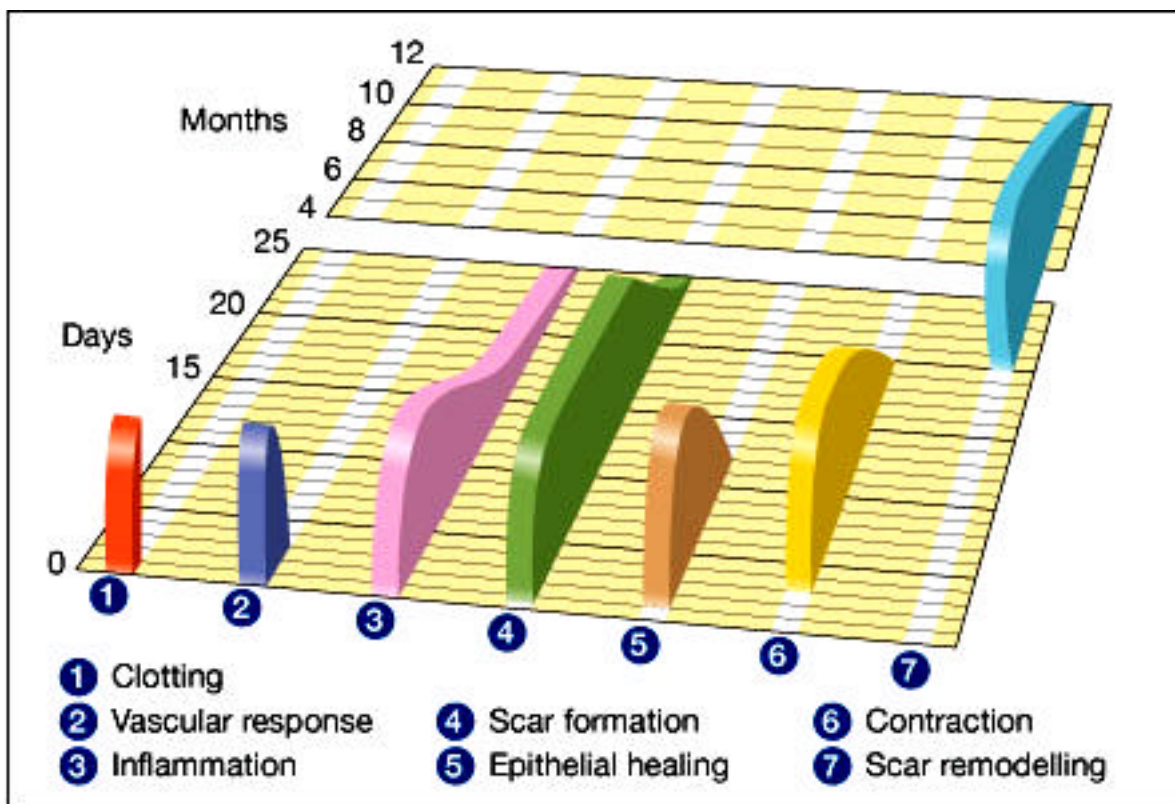


Figura 2 - Esquema demonstrando a evolução do processo de reparo de uma ferida cutânea.

Fonte: http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/images/New_fig_3.jpg.

2.3 Feridas

Uma ferida é definida como sendo qualquer lesão que interrompe a estrutura anatômica ou a função fisiológica do tecido biológico (BORGES *et al.*, 2001). Pode ser representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (ABLA; ISHIZUKA, 1995).

2.3.1 Classificação

As feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparo dos tecidos, em agudas e crônicas. As agudas decorrem de cirurgias e traumas, onde o processo de reparo se dá de forma normal, em tempo adequado e sem agravos. As feridas crônicas são aquelas onde o reparo não ocorre em tempo esperado, apresentando complicações (ABLA; ISHIZUKA, 1995).

Outro tipo de classificação é efetuado com base na observância anatômica da profundidade da ferida. Essa pode ser classificada como superficial, quando envolve apenas a epiderme, com perda parcial, quando envolve a epiderme e a porção superior da derme ou com perda total onde existe acometimento da epiderme, derme, tecido subcutâneo e eventual invasão de músculos, tendões e ossos. Esse sistema de classificação é usado para estadiamento de feridas crônicas (SILVA *et al.*, 2007)

As feridas podem ser classificadas segundo diversos parâmetros, que auxiliam no diagnóstico, na evolução e na definição do tipo de tratamento, tais como: quanto ao diagnóstico etiológico: define a origem da doença que propiciou o aparecimento da lesão cutânea, quanto à causa: define o mecanismo de ação, quanto à morfologia: descreve a localização, número, dimensão e profundidade, quanto ao grau de contaminação: limpa, contaminada ou infectada, quanto à fase cicatricial: define as três etapas: inflamatória, proliferativa e de maturação, quanto à característica do exsudato: relata a sua presença ou ausência, aspecto, coloração e odor, quanto às fístulas: indica presença, local e origem, quanto à característica do leito da ferida: necrótico, fibrinoso, necrótico-fibrinoso, granulação e epiteliação, quanto à cultura da secreção: define o agente etiológico e a antibioticoterapia específica, quanto à evolução da ferida: aguda ou crônica e quanto ao tipo de cicatrização: primária, secundária ou primária tardia (ABLA; ISHIZUKA, 1995).

2.3.2 Tipos de cicatrização

No processo de reparação de uma ferida ocorrem todos os eventos inerentes ao processo de reparo tecidual (BORGES *et al.*, 2001).

O processo de cicatrização, na maioria das vezes, busca resultado semelhante ao processo de regeneração, preenchendo o espaço perdido por uma lesão (CONTRAN *et al.*, 2000).

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo e ordenado que, segundo Contran *et al.* (2000) envolve várias etapas: introdução de um processo inflamatório agudo pela lesão inicial, regeneração das células parenquimatosas com subsequente migração e proliferação, síntese de proteínas da matriz extracelular, remodelagem de tecido conjuntivo e de componentes parenquimatosos e colagenização com aquisição de resistência da ferida.

Nas feridas cujas bordas são aproximadas por sutura (feridas incisionais) e que não tenham outro agravante, como infecções, a cicatrização é favorecida e denominada cicatrização primária ou por primeira intenção. Em contrapartida, nas feridas mais amplas

(excisionais), com bordas afastadas ou com agravantes, a cicatrização ocorre por segunda intenção (BOGLIOLO, 1978; FARIA, 2003). A cicatrização por primeira intenção é mais rápida e leva à formação de cicatrizes menores, visto que a destruição tecidual nas bordas é menor, quando comparada à ferida excisional (BOGLIOLO FILHO, 2004).

A cicatrização por primeira intenção (sem perda de tecido) difere da cicatrização por segunda intenção em vários aspectos, como na reação inflamatória mais intensa, formação de maior quantidade de tecido de granulação, e na grande contração da ferida, principalmente em grandes feridas superficiais (GARDNER; HIATT, 2003). A figura 2 demonstra o processo.

2.3.3 Tratamentos

Uma revisão histórica demonstra a secular busca por um tratamento de feridas que ofereça uma melhor cicatrização em um curto espaço de tempo. Desde a pré-história, vários agentes, como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Há relatos que na antiguidade as mesmas eram lavadas com água ou leite e o curativo era realizado com mel ou resina. Outras vezes eram cobertas com lã de carneiro, folhas e cascas de árvore. Hipócrates preconizava que as feridas contusas fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração, remover material necrótico e reduzir a inflamação (ANDRADE *et al.*, 1992).

O avanço da ciência levou a descoberta de tratamentos mais eficientes. Hoje se sabe que vários fatores podem contribuir para a alteração desse processo de reparo em tecidos biológicos, alguns dificultando e outros o facilitando.

Os fatores agravantes são classificados em sistêmicos e locais. Os sistêmicos incluem a idade, a imobilidade, o estado nutricional, vascularização, doenças associadas e o uso de medicamentos contínuos e drogas imunossupressoras. Os fatores locais são a presença de infecção, a localização anatômica da ferida, presença de tecido desvitalizado, entre outros (SANTOS, 2000). Dentre os fatores facilitadores, podem ser destacadas algumas terapias, como a farmacoterapia (LAVAGNA *et al.*, 2001) e a fototerapia (HAWKIN; ABRAHAMSE, 2006).

2.4 Diabetes mellitus

O *diabetes mellitus* (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. A doença se caracteriza pela resposta defeituosa ou deficiente da insulina, e se manifesta pela utilização inadequada dos carboidratos (glicose) com conseqüente hiperglicemia (CONTRAN *et al.*, 2000). É considerada uma síndrome de etiologia múltipla, que decorre da ausência de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. As conseqüências do DM no longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. Com freqüência, os sintomas clássicos (perda inexplicada de peso, polidipsia e poliúria) estão ausentes, entretanto, poderá existir hiperglicemia de grau suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido. A síndrome diabética passa por um estágio de distúrbio do metabolismo da glicose, caracterizado por valores glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética antes do surgimento de hiperglicemia mantida, acompanhada do quadro clínico clássico do DM (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

As formas mais comuns e importantes do DM surgem de distúrbios primários do sistema de sinalização das células ilhota-insulina do pâncreas. O diabetes pode ser dividido em duas variantes, tipo 1 e tipo 2, que diferem entre si nos padrões de herança, respostas à insulina e origens, com defeitos genéticos menos comuns das funções das células β pancreáticas. O diabetes tipo 1 é também denominado de *diabetes mellitus* insulino-dependente e é responsável por cerca de 10% do diabetes primário. A maioria dos 80 a 90% dos pacientes restantes apresentam diabetes tipo 2, conhecido como diabetes insulino-independente (CONTRAN *et al.*, 2000).

O DM é uma doença que apresenta lesões patológicas nas Ilhotas de Langerhans e em outros órgãos pela insuficiência de insulina, denominada Diabetes Tipo I, ou deficiência da ação da insulina, denominada Diabetes Tipo II (LERNMARK, 1985). Embora os dois tipos de diabetes tenham mecanismos patogênicos diferentes, as complicações tardias nos vasos sanguíneos, rins, olhos e nervos caracterizadas pela hiperglicemia, glicosúria, tendência ao desenvolvimento de aterosclerose, microangiopatia, nefropatia e neuropatia são as mesmas e constituem as principais causas de morbidade e mortalidade da doença (CONTRAN *et al.*, 2000).

O DM é caracterizado pela heterogeneidade de distúrbios hiperglicêmicos, onde esta hiperglicemia é considerada um resultado da deficiência insulínica, em presença excessiva, de forma relativa ou absoluta, de glucagon. Essa deficiência excessiva da insulina desenvolve a cetose e é decorrente de uma alteração pancreática caracterizada por uma menor secreção de insulina ou uma menor ação hormonal em nível periférico (WILSON; FOSTER, 1998).

A insulina é um hormônio considerado anabolizante e propicia a utilização da glicose no tecido adiposo e no tecido muscular, inibindo a glicogenólise e a neoglicogênese hepática, com aumento da síntese protéica e lipídica. Na sua ausência, ocorre uma diminuição da utilização da glicose pelos tecidos insulino-dependentes e a concomitante manutenção de um ritmo aumentado de produção endógena da glicose com conseqüente aumento dos seus níveis sanguíneos. As Ilhotas de Langerhans, micro-órgãos localizados no pâncreas, através das células β são as responsáveis pela produção desse hormônio. Quando ocorrem alterações pancreáticas nesses órgãos, ocorre uma diminuição da produção de insulina com o estabelecimento do DM (GUYTON; HALL, 1998; FUCHS *et al.*, 2004).

O emagrecimento do paciente, observado no DM, é causado pelo estado catabólico, com aumento da mobilização lipídica e degradação protéica, e associado às perdas hidroeletrólíticas. Esse estado é proporcional à deficiência insulínica. Em casos mais graves são observados cetose, desidratação, cetoacidose ou mesmo coma. No entanto, o quadro clínico do DM revela hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento, prurido freqüente, cetose esporádica e repercussões no metabolismo glicídico, lipídico, protéico e hidromineral. Em longo prazo podem ocorrer macroangiopatias, aterosclerose, e outras lesões vasculares, que levam ao comprometimento dos olhos, rins, nervos, músculos, pele, ossos, placenta, pulmões, provocando danos no endotélio com espessamento da membrana basal, aumento da adesividade e viscosidade plaquetária, agregação eritroplaquetária, obliteração e microtromboses (LACERDA, 1988).

O comprometimento da função da insulina afeta, além do metabolismo da glicose, o metabolismo dos lipídios e das proteínas. A assimilação da glicose no tecido adiposo e muscular encontra-se acentuadamente diminuída ou abolida. O armazenamento de glicogênio hepático e muscular bem como a glicogenólise são cessados, determinando uma hiperglicemia de jejum e glicosúria. A glicosúria por sua vez provoca uma diurese osmótica com conseqüente poliúria e acentuada perda de água e eletrólitos. A perda de água elevada tende a provocar a depleção de água intercelular, estimulando os receptores da sede no cérebro, causando uma sede intensa (polidipsia). A deficiência da insulina causa uma oscilação entre o anabolismo provocado por esse hormônio e o catabolismo das proteínas e lipídios, levando à

proteólise, onde os aminoácidos são removidos pelo fígado e utilizados para formação de glicose. Esse quadro leva a um balanço energético negativo, quer resulta no aumento do apetite (polifagia). A deficiência de insulina também provoca uma degradação excessiva das reservas adiposas, aumentando o índice de ácidos graxos livres. A oxidação desses dá origem a corpos cetônicos, causando cetonemia ou cetonúria (CONTRAN *et al.*, 2000).

2.4.1 Fármacos hiperglicemiantes

Existem vários fármacos capazes de induzir um estado hiperglicêmico e por isso são utilizados na indução do diabetes em experimentações animais. A maioria age inibindo as células β pancreáticas determinando a depressão da secreção de insulina com conseqüente elevação dos níveis sanguíneos de glicose. Dentre os agentes hiperglicêmicos mais comumente utilizados com esse propósito podem ser citados o diazóxido, a fenitocina, a clorotiazida a estreptozotocina e a aloxana (HARDMANN *et al.*, 2003).

A aloxana e a estreptozotocina são as drogas que apresentam citotoxicidade específica para as células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas mais estudadas. O mecanismo de ação de ambas envolve a determinação de uma insuficiência primária de produção insulínica no pâncreas, que determina uma resposta trifásica nos níveis de glicose durante as primeiras horas de administração, com conseqüente estabelecimento de um estado hiperglicêmico permanente nas 24 horas seguintes, característico do diabetes.

A estreptozotocina (STZ) é uma droga muito utilizada para a indução experimental do diabetes, pois administração em ratos adultos provoca um estado hiperglicêmico severo. Apesar desse fato, alguns trabalhos demonstraram que em experimentos crônicos, a administração de STZ tem potencial oncogênico, desencadeando o aparecimento do insulinoma (hiperinsulinismo) que leva a hipoglicemia ou mesmo a tumores no fígado e nos rins (ARISON; FEUDALE, 1967; KAZUMI *et al.*, 1978; IWASE *et al.*, 1991).

A aloxana ou alloxan é um composto químico descoberto por Justus Von Liebig e Friedrich Wöhler, depois da descoberta da uréia, em 1828. O nome é derivado da alantoína, um produto do ácido úrico excretado pelo feto no alantóide e do ácido oxalúrico, derivado do ácido oxálico e da uréia, achados na urina. Originalmente a aloxana é obtida pela oxidação do ácido úrico pelo ácido nítrico.

A aloxana (5, 6 Dioxiuracil monohidrato) possui uma massa de 142.07 g/mol e um ponto de fusão igual a 256 °C. Sua fórmula molecular é $C_4H_2N_2O_4$ e é representada pela figura 3.

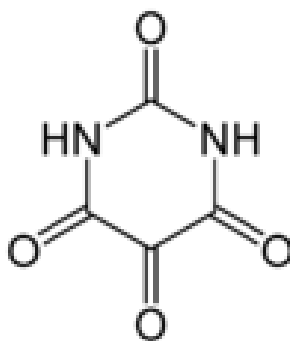


Figura 3 - Fórmula estrutural da aloxana.

A aloxana é um composto hidrófilo, totalmente solúvel em água, que prontamente se decompõe em pH neutro (LENZEN; MUNDAY, 1991; MUNDAY *et al.*, 1993).

A atividade diabetogênica da aloxana foi inicialmente observada por Dunn e colaboradores, em 1943, quando estudavam os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção da lesão renal em coelhos e desde então permaneceu como uma opção econômica e amplamente utilizada por inúmeros pesquisadores como alternativa à indução do diabetes experimental (JUNOD *et al.*, 1969; ORLOFF *et al.*, 1975; ORLOFF *et al.*, 1988)

A droga foi amplamente estudada com o objetivo de identificar a seu mecanismo de ação na destruição das células β pancreáticas (JORNS *et al.*, 1997).

A aloxana induz um estado hiperglicêmico, com conseqüente produção de diabetes química, devido aos seus efeitos citotóxicos nas células β das ilhotas de Langherans pancreáticas. A ação da droga ainda não está completamente esclarecida, porém existem relatos de que a mesma se acumula rápida e seletivamente nas células β causando necrose e seu completo desaparecimento (ASAYAMA *et al.*, 1984). Alguns estudos relatam o efeito da aloxana nos canais iônicos e no potencial de membrana dessas células (HERSON; ASHFORD, 1997). Por outro lado, outros estudos afirmam que a inibição da produção de insulina pelas células β se dá por outros mecanismos, que não envolvem a de necrose e/ou apoptose das mesmas (GORUS *et al.*, 1982).

Borg *et al.* (1979) em seus estudos concluíram que a aloxana interfere de forma rápida e reproduzível com o metabolismo oxidativo das ilhotas pancreáticas e que esse feito é eficientemente prevenido pela glicose.

A droga inibe a ação das enzimas glicoquinasas e hexoquinasas e sofre redox na presença fisiológica de agentes redutores, gerando espécies reativas de oxigênio (superóxidos). Acredita-se que esses superóxidos estão envolvidos nas mudanças tóxicas que desencadeiam a morte das células β pancreáticas (OBERLEY, 1988).

A ação diabetogênica da aloxana pode ser caracterizada pela produção de radicais livres com elevada toxicidade, especificamente para as células β pancreáticas, levando a uma degeneração e morte definitiva das mesmas (GRANKVIST *et al.*, 1979). A toxicidade seletiva da aloxana para essas células é atribuída à capacidade das células β acumularem a mesma, somado ao fato de que a célula β pancreática demonstra uma maior suscetibilidade aos radicais peróxidos, se comparadas às demais células do organismo humano (JORNS *et al.*, 1999).

2.4.2 Diabetes e reparo tecidual

O diabetes, diante da intolerância à glicose causada pela deficiência da insulina circulante, causa uma série de alterações na homeostase e se refletem no retardo do reparo tecidual que é tão mais grave e precoce quanto pior for o controle da hiperglicemia.

As alterações histológicas decorrentes da hiperglicemia estão presentes em diversos tecidos, uma vez que se trata de uma desordem sistêmica. Grande parte dessas alterações parecem ser provenientes do acúmulo de AGEs (*advanced glycosylation end*) ou produtos terminais de glicosilação avançada irreversíveis nos tecidos. A interação entre os AGEs e as células endoteliais causa proliferação com edema nessas células e um espessamento das membranas basais com conseqüente aumento da parede dos vasos sanguíneos e obliteração do lúmen vascular, prejudicando o suprimento tissular de oxigênio e nutrientes e a eliminação de metabólitos. Estas alterações vasculares estão diretamente relacionadas à incidência e à progressão de outras complicações do diabetes como a microangiopatia, neuropatia, nefropatia e retinopatia (CAMPBELL, 1971; SEPPALA *et al.*, 1997; RENVERT, 2003; JAKUS; RIETBROCK, 2004).

O comprometimento das fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento na presença da hiperglicemia na ausência de insulina pode ser observado através de vários eventos. Existem evidências de que a insulina é um hormônio pró-inflamatório e a sua ausência compromete o processo inflamatório (LEME, 1981).

O diabetes promove uma cronificação do processo inflamatório. Na presença da doença há uma exacerbação do número de células inflamatórias no local da lesão com macrófagos congestos em relação ao material fagocitado e com fibroblastos menores e menos desenvolvidos, demonstrando um retardo na resolução da fase inflamatória e conseqüentemente um prejuízo no processo de reparo (GOLUB *et al.*, 1978). Também foram encontradas evidências clínicas e experimentais que atribuem à anormalidade de cicatrização

no diabético ao déficit de formação do colágeno, levando a defeitos no tecido de granulação e vasos sanguíneos (GOODSON; HUNT, 1979).

Por outro lado, Nishigaki (1989) estudou o processo de cicatrização em ratos diabéticos e relatou uma resposta inflamatória insignificante no período imediatamente posterior à lesão. Também observou uma incompleta formação de rede de fibrina, com reduzida atividade fibroblástica e retardo na epitelização.

Um estudo conduzido por Nagy *et al.* (1960) mostrou que ratos hiperglicêmicos produzem menos tecido de granulação que ratos normais, mesmo sob a influência local do hormônio do crescimento.

Grandini (1978) estudou os efeitos do diabetes induzido na cicatrização de feridas de ratos submetidos à pancreatectomia parcial e observou que os animais diabéticos apresentaram retardo na reparação. As diferenças no processo de reparo foram observadas principalmente na diferenciação comprometida dos fibroblastos com conseqüente diminuição da maturação do tecido conjuntivo.

Golub *et al.* (1978) observaram que a atividade collagenolítica com redução da síntese de colágeno estava presente em ratos diabéticos. Outros autores sugerem que na pele de ratos diabéticos, além do retardo e diminuição da síntese de fibras colágenas, há um maior catabolismo das fibras sintetizadas, diminuindo o colágeno existente nos tecidos (SCHNEIR *et al.*, 1979).

Bowersox (1986) estudou o metabolismo do colágeno em ratos diabéticos com a utilização de radioisótopos e constatou que, associada à baixa síntese, existia também uma elevada degradação do colágeno pré-existente na pele desses animais.

2.5 Uso da luz coerente e da luz não coerente na biomodulação tecidual

2.5.1 Luz coerente e não coerente

A luz coerente é uma radiação com uma largura de banda muito estreita. A coerência é uma relação entre duas ondas luminosas, que mantêm uma relação de fases constante, uma não afetando a outra (YOUNG, 1998).

Exemplos de luz coerente são os lasers, dos quais a radiação emitida possui fótons em fase, isto é, com disposição temporal e espacial idêntica. Em contrapartida as fontes de luz incandescente e a fluorescente não possuem essas propriedades e por isso são denominadas

fontes de luz não coerente. Os LEDs (diodos emissores de luz) também não apresentam essa propriedade e, portanto emitem uma luz não coerente (PACHECO, 2007).

Tanto a luz coerente quanto a não coerente vem sendo empregadas na biomodulação tecidual, através da fototerapia ou terapia com o emprego de luz. Contudo, os estudos de fototerapia se concentraram na terapia com laser em baixa potência (TLBP) e é recente o emprego dos LEDs no reparo tecidual (WHELAN *et al.*, 2001; 2003).

2.5.2 Princípios do sistema laser

O termo laser é acrônimo de *light amplification by stimulated emission of radiation*, que significa luz amplificada por emissão estimulada de radiação.

Lasers são considerados aparelhos que geram ou amplificam radiação coerente em frequências na região do infravermelho, visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (PACHECO, 2007).

O princípio de funcionamento de um sistema laser consiste no bombeamento de um fóton, ou partícula energética de luz, para um meio ativo ou meio laser. Essa ação faz com que os átomos do meio laser absorvam, reflitam ou transmitam a energia fornecida por esse fóton. Nas duas últimas situações (transmissão ou reflexão) não haverá modificações na energia luminosa do sistema, mas quando existe absorção o fenômeno é observado (YOUNG, 1998).

A absorção do fóton (n) fornecido pelo processo de bombeamento faz com que os elétrons dos átomos do meio laser sejam excitados e ocupem um nível quântico superior de energia, gerando uma inversão de população. O sistema permanece por um período muito curto nesta situação, cerca de $10^{-8}s$, e ao retornar a sua situação original elimina seu excesso de energia na forma de liberação de dois fótons ($2n$) exatamente com as mesmas características do fóton incidente. Esse princípio é descrito como emissão estimulada de radiação (BAXTER, 1998; LOW; REED, 2001).

Os fótons liberados pelo processo de emissão estimulada são realimentados ao sistema até ganharem energia suficiente para serem liberados da cavidade laser ou de ressonância, gerando o efeito laser.

Para que o laser seja gerado, um aparelho laser deve possuir basicamente três elementos: uma cavidade de realimentação óptica, um o meio laser e um sistema de bombeamento (figura 4).

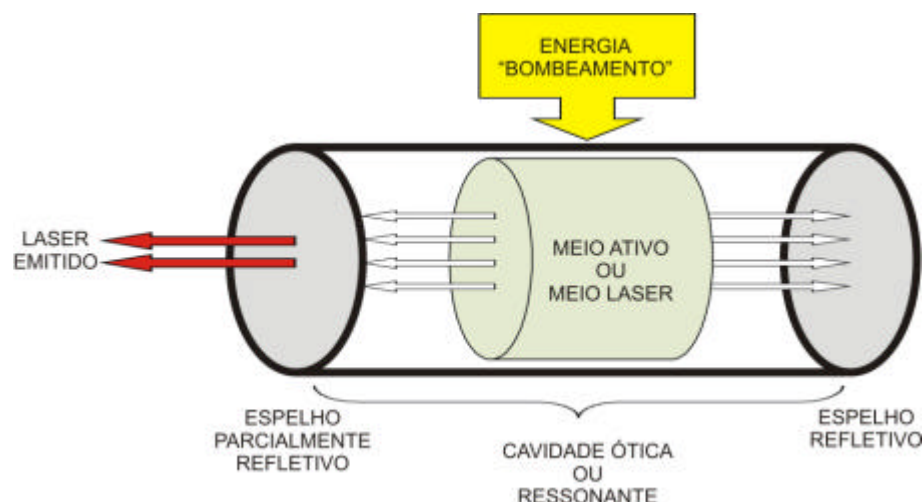


Figura 4 - Esquema de uma cavidade laser.

O sistema de bombeamento consiste em uma fonte de energia que permita o estímulo inicial da excitação atômica do meio laser possibilitando a emissão estimulada de radiação. Esta energia pode ser fornecida de várias maneiras: energia elétrica (lasers de diodo ou de gases), energia luminosa produzida por lâmpadas flash (lasers da família YAG) ou por outro laser, como os lasers com meio ativos líquidos que geralmente são bombeados por lasers de argônio (PACHECO, 2007).

O meio ativo ou meio laser pode ser constituído por diversos tipos de materiais: alguns sólidos, cristais, semicondutores, vapores, gases e líquidos. Cada um desses materiais fornecendo uma variedade diferente de emissões no espectro eletromagnético (GENOVESE, 2000). Os meios laser mais utilizados nas irradiações de LLLT (*low level laser therapy*) são os da mistura gasosa de hélio e neônio (HeNe), e os semicondutores (diodo) de arseneto de gálio (GaAs), arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) e fosfato de índio, gálio e alumínio (InGaAlP) que habitualmente produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950 nm (BAXTER, 1994). A figura 4 representa um laser com meio ativo gasoso e a figura 5 um laser de diodo.

A cavidade óptica, câmara de realimentação óptica ou câmara ressonante óptica é constituída por um tubo que contém o meio ativo ou meio laser. Nesse tubo existem espelhos alinhados de maneira a permitir o deslocamento ressonante dos fótons, fazendo com que passem várias vezes pelo meio ativo ou meio laser. Isso faz com que os fótons resultantes da emissão estimulada adquiram energia toda vez que passem pelo meio ativo (amplificação), de maneira a acumularem energia suficiente para que, quando alcancem um desses espelhos que possui uma propriedade refletiva menor aos demais (espelho parcialmente refletivo), o atravessem e sejam liberados da câmara de ressonância ou cavidade óptica, emitindo o laser (PACHECO, 2007).

O primeiro aparelho laser que se tem conhecimento foi desenvolvido por Theodore Maiman, em 1960. Maiman usou teorias desenvolvidas anteriormente, como a dos MASERS - amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação (acrônimo para *Microwave Amplifiers by the Stimulated Emission of Radiation*), para desenvolver um laser de rubi operando em 694,3nm. Desde então, várias fontes laseres foram desenvolvidas utilizando diversos materiais ativos e técnicas de bombeamento ou ativação (GENOVESE, 2000).

Concomitantemente a essa evolução, a aplicação dos laseres foi se ampliando para diversas áreas, desde dispositivos para uso militar a instrumentos de diagnóstico e terapia nas áreas de saúde, principalmente pela possibilidade de focalização em pequenas áreas e a emissão de altas densidades de energia (BAXTER, 1994; NICOLAU, 2001).

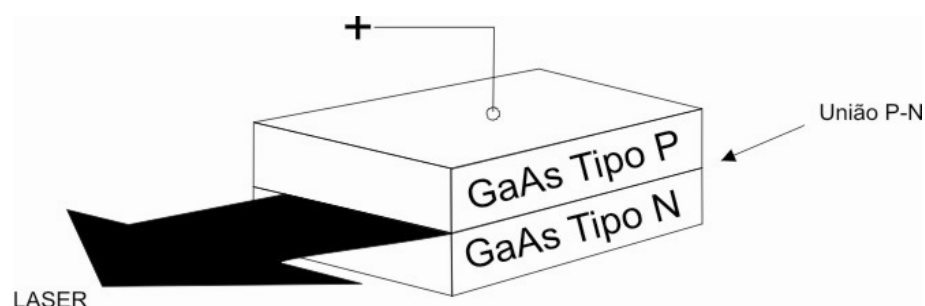


Figura 5 - Esquema de um laser de diodo (GaAs).
Fonte: Desenho baseado em YOUNG(1988).

2.5.3 Propriedades e comportamento da radiação laser

Os feixes de radiação emitidos pelos laseres possuem importantes características de direcionalidade, pureza espectral e intensidade (PINHEIRO, 1998a; PACHECO, 2007). Comparativamente a uma lâmpada fluorescente ou incandescente convencional e a um LED, as características que diferem a luz laser são a monocromaticidade, a brilhância, a coerência e a direcionalidade (NICOLAU, 2001).

A propriedade de direcionalidade ou unidirecionalidade da luz laser é representada pelo quase paralelismo do feixe de luz ou fótons produzidos pelo equipamento laser, com discreta divergência angular e acentuada colimação (PACHECO, 2007). Alguns autores afirmam que a luz colimada permite concentrar o feixe de luz em um ponto focal, mantendo a potência óptica ao longo de distâncias consideráveis e determinando uma maior concentração de energia ou brilho (BAXTER, 1998; GENOVESE, 2000).

O laser é um feixe de luz quase monocromático porque é formado somente por ondas comprimento que oscilam muito pouco e, portanto, possuem praticamente a mesma frequência (PACHECO, 2007).

A monocromaticidade é baseada no fenômeno da geração de fótons com comprimento de onda situado em um valor definido no espectro eletromagnético, com oscilações desprezíveis e em uma faixa muito pequena de variação, gerando a visualização de apenas uma cor. No outro extremo da análise teríamos fontes geradoras de luz compostas por uma grande variedade de comprimentos de onda, que resultam na visualização da cor branca (BAXTER, 1994). O laser é uma das poucas fontes de luz que produzem um comprimento de onda específico (YOUNG, 1998).

A coerência espacial e temporal da luz laser está relacionada com os mecanismos de emissão estimulada. O laser é um exemplo típico de excitação coerente cumulativa de energia. A coerência do laser é descrita pelo resultado da emissão estimulada, que gera fótons coerentes onde as energias se somam e se deslocam na mesma direção no espaço (coerência espacial), possuindo as depressões e os picos das ondas de luz emitida em perfeita sintonia temporal, ou seja, em fase e influenciando na amplitude e potência (coerência temporal) (PACHECO, 2007).

O laser é uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada e que, em contato com diferentes tecidos biológicos, resulta, dependendo do tipo e de outros parâmetros do laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares (PINHEIRO, 1998b).

Os aparelhos laser podem levar aos tecidos uma grande quantidade de energia com extrema precisão e por isso seu emprego na biomodulação tecidual. De maneira geral são classificados como não cirúrgicos ou de baixa potência e lasers cirúrgicos ou de alta potência (PINHEIRO, 1998a; GENOVESE, 2000).

Os lasers de alta potência (1 a 100W) foram introduzidos na medicina inicialmente em cirurgias oftalmológicas e até os dias de hoje sua aplicação médica é no corte, solda e destruição de tecidos, utilizando por base as propriedades fototérmicas e fotoablativas do laser com o tecido (AMIR *et al.*, 2000).

Os lasers de baixa potência são amplamente utilizados terapeuticamente (PINHEIRO, 1998a). Esses lasers estão situados na porção visível do espectro, bem como no infravermelho próximo. Os comprimentos de onda utilizados estão entre 600 e 1000nm, faixa onde são menos absorvidos e conseqüentemente apresentam uma boa transmissão na pele e nas mucosas. Até mesmo porque o emprego da luz como método terapêutico implica na sua

utilização em uma faixa estreita do espectro eletromagnético, com comprimentos de onda que vão de 300nm a 1.100nm (ANDERS *et al.*, 1993).

O comprimento de onda do laser determina a ocorrência de diversos eventos celulares (VEÇOSO, 1993; GENOVESE, 2000). Vários efeitos podem ser esperados, como antiálgicos, bioestimulantes de trofismo celular, antiinflamatório, antiedematoso, normalizador circulatório (BUSO, 2006) e estimulante do reparo tecidual, que para alguns autores é o mais expressivo (FARIA, 2006; RABELO *et al.*, 2006; SILVA, 2006).

Esses efeitos são procedentes de uma complexa interação da luz com tecidos onde a energia depositada pode ser refletida, ocorrendo quando parte da luz incidente retorna, sem haver interação com a matéria, em direção a sua fonte de excitação; absorvida, quando o tecido biológico absorve a luz laser, sendo esta absorção dependente tanto do comprimento de onda emitido, como do coeficiente de absorção tecidual; difundida, quando a luz laser muda sua angulação no interior do tecido e transmitida, ocorrendo quando a radiação laser consegue atravessar o tecido biológico (Figura 6) (TATARUNAS *et al.*, 1998; GENOVESE, 2000).

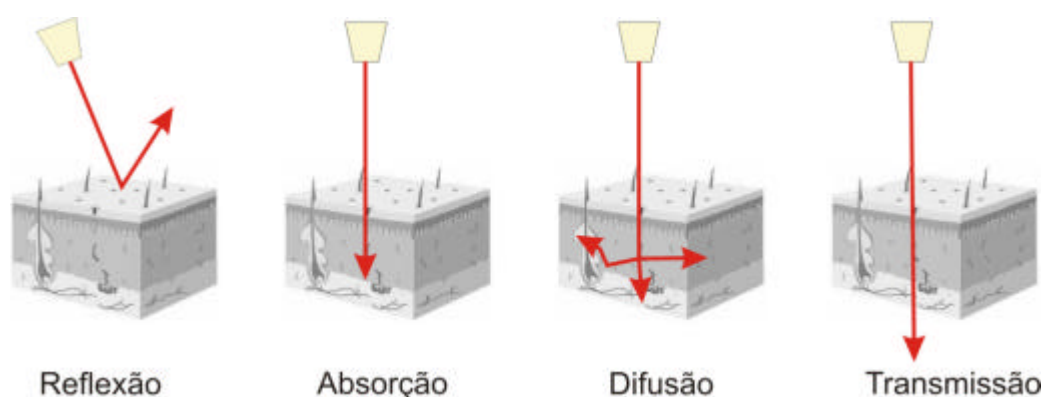


Figura 6 - Possibilidades de interação da luz com os tecidos biológicos.

Para eficácia terapêutica da biomodulação é esperado que a energia emitida pelo laser seja absorvida e transformada através de efeitos bioquímicos e/ou biofísicos no tecido biológico, podendo ainda ser propagada para tecidos vizinhos (GENOVESE, 2000).

Cools (1984) dividiu os efeitos da TLBP (terapia com laser de baixa potência) em dois grupos. Os efeitos no primeiro grupo foram denominados de primários ou diretos, podendo ser bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Os do segundo grupo foram denominados de secundários ou indiretos e envolvem a promoção de estímulos como o da microcirculação e o trofismo celular.

A laserterapia promove um efeito cicatricial determinado por alguns mecanismos, como o incremento na produção de ATP (KARU *et al.*, 1995), proporcionando um aumento da

atividade mitótica (SILVA, 1998), além do aumento da síntese protéica (PASSARELLA *et al.*, 1988; GRECO *et al.*, 1989). Também é observado um estímulo da microcirculação com melhora do aporte nutricional que, associado ao aumento da atividade mitótica, resulta numa multiplicação celular facilitada e neoformação vascular a partir de vasos existentes (COOLS, 1984; SILVA, 2006).

A TLBP também contribui para a deposição de fibras colágenas, tanto na fase inicial como na fase tardia do tratamento, bem como na minimização da presença de células inflamatórias na zona de lesão na fase inicial do processo cicatricial (TAVARES *et al.*, 2005).

2.5.4 Princípios do sistema LED

A palavra LED tem origem no termo inglês *light emitting diode* que significa diodo emissor de luz.

Os diodos emissores se tornaram um tipo relativamente novo de fonte de luz e já demonstraram ter muitas aplicações nos painéis alfanuméricos e outros. Como são pequenos e funcionam com baixa potência, também são muito utilizados nos sistemas de comunicação por via óptica (YOUNG, 1998).

Diodo é um tipo simples de semicondutor, material esse com habilidade variada de condução de corrente elétrica. Geralmente são obtidos de um material que teve impurezas (átomos de outros materiais) adicionadas, por um processo chamado de dopagem. Os LEDs são geralmente dopados com arseneto de gálio ou fosfeto de gálio. No caso do fosfeto de gálio, emitem luz visível vermelha ou amarela, de acordo com a concentração de fósforo e se dopado com arseneto de gálio, emitem radiações infravermelhas. Utilizando-se fosfeto de gálio dopado com nitrogênio, a luz emitida pode ser verde ou amarela (MEDEIROS, 2001).

O LED é um dispositivo optoeletrônico que consiste na junção entre semicondutores fortemente dopados tipo p e tipo n, como o arseneto de gálio. Essas duas regiões distintas (p e n) possuem propriedades distintas. A primeira, denominada de “p”, é receptora de elétrons e a segunda, denominada de “n”, é doadora de elétrons (MEDEIROS, 2001). Isso significa que qualquer semicondutor do tipo n tem um número muito grande de elétrons de mobilidade alta, ao passo que os materiais tipo p têm orifícios ou lacunas, que são positivos e muito menos móveis. Quando dois materiais desse tipo são unidos, as cargas móveis tendem a se reorientar, isto é, os elétrons reposicionam-se espontaneamente podendo cair em lacunas vazias do material tipo p até que se estabeleça a estrutura de níveis de energia. Este fenômeno implica na queda de elétrons para orbitais inferiores, liberando energia na forma de fótons. Isso

acontece em qualquer diodo, mas só é visível quando o diodo for composto de certos materiais. Os átomos de certos diodos, por exemplo, são organizados de tal modo que o elétron se desloca a uma distância relativamente pequena. Como resultado, a frequência do fóton emitido é tão baixa que é invisível para o olho humano, pois está na porção infravermelho do espectro eletromagnético (YOUNG, 1998).

Entretanto, para que a emissão de luz ocorra de forma duradoura e observável, ou seja, para que exista luminescência, uma fonte de eletricidade deve ser aplicada ao diodo. A luz emitida, portanto, se dá devido à energização da junção p-n por um processo denominado de eletroluminescência (RABELO, 2003; FARIA, 2006).

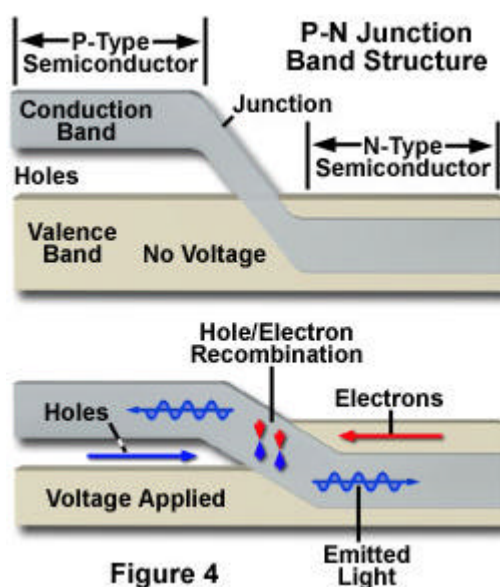


Figura 7 - Representação da junção e semicondutores para a construção de um LED.
 Fonte: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lasers/diodelasers/index.html>.

2.5.5 Propriedades e comportamento da radiação emitida pelo LED

A principal diferença da luz emitida pelo LED em relação à emitida pelo laser é a ausência de coerência, pela alta divergência do feixe luminoso emitido e pela emissão em uma faixa ampla do espectro, oscilando em uma amplitude de cerca de 20nm (PACHECO, 2007). Também ocorre a inexistência de uma cavidade ressonante na sua produção (RUBINOV, 2007).

Analisando a coerência da luz, sob o ponto de vista da biomodulação, é válido observar que, em condições fisiológicas, a absorção da luz de baixa intensidade pelo sistema biológico é de natureza não coerente.

É sabido que o tempo de decomposição da coerência de fotoexcitação determina a interação com moléculas adjacentes, sobre condições menores do que 10^{-12} segundos. Em uma fototerapia com aplicação de luz coerente sobre a pele, o tempo médio de excitação depende da intensidade da luz. Por exemplo, aplicando-se uma fluência de 1 mW/cm^2 , o tempo é em torno de 1 segundo, determinando que a coerência seja perdida ao longo dos primeiros estratos da pele, antes que produza a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras (RUBINOV, 2007).

Outro aspecto importante na análise das propriedades do LED é a ampla faixa espectral que o mesmo ocupa, com amplitude maior de variação no comprimento de onda da luz emitida, se comparado ao laser (figura 8).

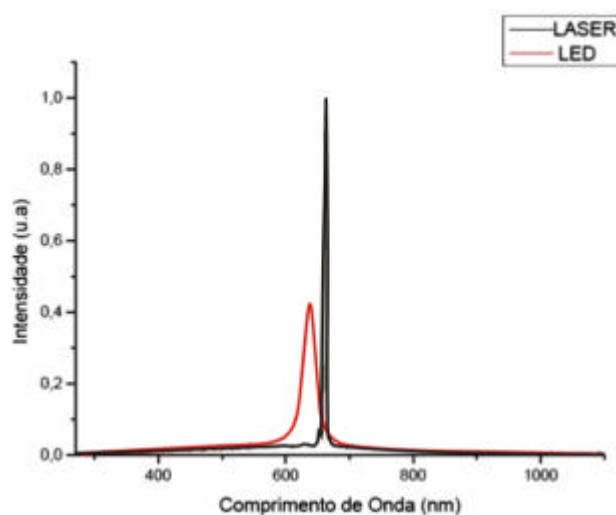


Figura 8 - Distribuição espectral do LED e do Laser.
Fonte: Corraza, 2007.

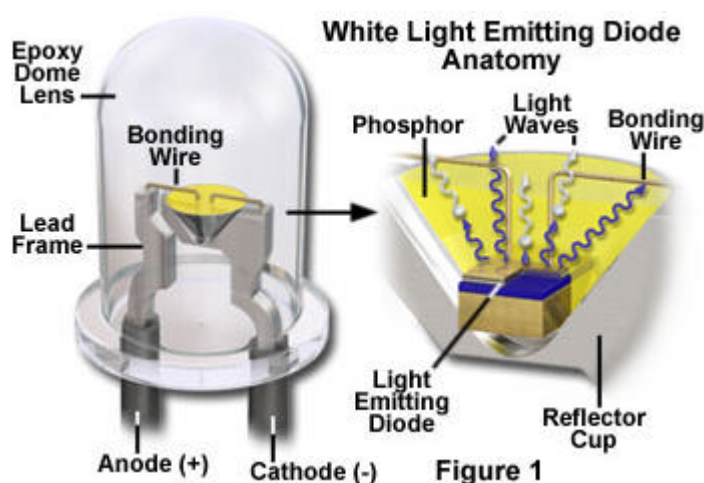


Figura 9 - Esquema de um LED (diodo emissor de luz).
Fonte: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/ledsintro.html>.

2.6 Emprego da fototerapia no reparo de feridas cutâneas

Vários estudos indicam os efeitos benéficos do emprego terapêutico da luz no reparo de feridas cutâneas. Pugliese *et al.* (2003) e Medrado *et al.* (2003) estudaram os efeitos da terapia com laser de baixa potência em feridas cutâneas de 72 ratos Wistar e concluíram que houve uma redução na reação inflamatória, um aumento da produção de colágeno e uma maior proliferação de miofibroblastos, principalmente nos grupos submetidos à fluência de 4 J/cm². Whelan *et al.* (2001) utilizaram fototerapia com LED e relataram que a mesma produziu in vitro aumentos no crescimento celular de 140-200% em fibroblastos, osteoblastos, e células músculo-esqueléticas de ratos, aumento do crescimento de 155-171% de células epiteliais normais humanas e diminuição de até 36 % no tamanho de feridas isquêmicas em ratos. Whelan *et al.* (2002) analisando o efeito da aplicação de LED sobre a mucosite oral de pacientes pediátricos transplantados concluíram que, embora mais estudos sejam necessários, a terapia com LED parece ser útil na prevenção de mucosite oral nesses pacientes. Whelan *et al.* (2003) concluíram, após estudos em esponjas de acetato de polivinil implantadas em dorsos de ratos geneticamente diabéticos, que o uso do LED para fototerapia potencializa o processo de reparo tecidual e é promissor na reabilitação de pacientes lesionados, dispondo os mesmos de forma mais rápida para o retorno às suas atividades normais.

A maioria dos estudos apontam para uma contribuição positiva da utilização da fototerapia com esse propósito (aproximadamente 89% dos estudos), revelando um incremento da formação de novos vasos, do número de fibroblastos e da produção de colágeno, bem como na aceleração da reepitelização (tabela 2).

Poucos estudos apresentaram resultados nulos (8,3%), quando do emprego de diferentes lasers comprovaram que não existiu benefício no uso da fototerapia em feridas cutâneas (ALLENDORF *et al.*, 1997, PETERSEN *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 2000a) (tabela 2).

Tabela 2 - Análise compartimentada do uso da fototerapia no reparo de feridas cutâneas.

Modelo	Agravo	Efeito	Fonte
Rato	Sem fatores agravantes	0	(ALLENDORF <i>et al.</i> , 1997)
		+	(KLEBANOV <i>et al.</i> , 2005)
		+	(GAL <i>et al.</i> , 2005)
		+	(AL-WATBAN e ANDRES, 2006)
		+	(GAL <i>et al.</i> , 2006)
		-	(YILMAZ <i>et al.</i> , 2006)
		+	(GLUSHKOVA <i>et al.</i> , 2006)
		+	(SILVEIRA <i>et al.</i> , 2007)
		+	(GARSSEN <i>et al.</i> , 2000)
		0	(WALKER <i>et al.</i> , 2000b)
		+	(AL-WATBAN e ZHANG, 2006)
		+	(NAKASONE <i>et al.</i> , 2003)
		+	(WHELAN <i>et al.</i> , 2003)
		+	(DEMIR, YARAY <i>et al.</i> , 2004)
		+	(DEMIR, BALAY <i>et al.</i> , 2004)
		+	(DO NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2004)
		+	(MENDEZ <i>et al.</i> , 2004)
		+	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2004)
		+	(STADLER <i>et al.</i> , 2005)
		+	(PINHEIRO <i>et al.</i> , 2005)
	Diabetes	+	(REDDY <i>et al.</i> , 2001)
	Diabetes	+	(MAIYA <i>et al.</i> , 2005)
	Diabetes	+	(REDDY, 2003)
	Diabetes	+	(RABELO <i>et al.</i> , 2006)
	Uso de corticóide	+	(PESSOA <i>et al.</i> , 2004b)
Humano	Sem fatores agravantes	+	(SIMUNOVIC <i>et al.</i> , 2000)
		+	(HOPKINS <i>et al.</i> , 2004)
	Diabetes	+	(SCHINDL <i>et al.</i> , 1998)
	Diabetes	+	(SCHINDL <i>et al.</i> , 2002)
	Diabetes	+	(YU <i>et al.</i> , 1997b)
Vaca	Sem fatores agravantes	+	(GHAMSARI <i>et al.</i> , 1997)
Cavalo	Sem fatores agravantes	0	(PETERSEN <i>et al.</i> , 1999)
In vitro	Sem fatores agravantes	+	(DANNO <i>et al.</i> , 2001)
		+	(WEBB e DYSON, 2003)
		+	(HAWKINS e ABRAHAMSE, 2005)
		+	(HAWKINS e ABRAHAMSE, 2007)

0 = efeito nulo + = efeito positivo - = efeito negativo.

A maioria dos estudos empregam ratos como modelos experimentais, tendo sido obtidos efeitos positivos da fototerapia. Contudo poucos estudos empregam fatores agravantes aos processos de reparo tecidual, justificando a realização de novos estudos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo propôs a verificação comparativa dos efeitos biomoduladores da terapia com laser (InGaAlP – 660nm, 30mW, 6J/cm²) e LED (640 ± 20nm, 30 mw, 6J/cm²) no reparo tecidual de feridas cutâneas dorsais de ratos portadores de diabetes induzido por aloxana submetidas a um único momento de irradiação, trinta minutos após o estabelecimento cirúrgico das lesões.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Análise da evolução clínica do processo de reparo das feridas dos grupos de animais diabéticos e controles, tratados e não tratados através de medidas biométricas;
- 2) Análise histomorfológica das lesões cutâneas dos espécimes em estudo, dos grupos de animais diabéticos e controles, tratados e não tratado;
- 3) Análise histomorfométrica das lesões cutâneas dos espécimes em estudo, dos grupos de animais diabéticos e controles, tratados e não tratados.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba e obteve aprovação, sob protocolo A058/CEP/2007, seguindo os princípios éticos da experimentação animal de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (anexo A).

4.2 Modelo experimental

Foram utilizados 54 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 180 e 250g, provenientes do biotério da UFSM - Universidade Federal de Santa Maria.

Os animais passaram por um período de ambientação de 10 dias no biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Comunitária Regional de Chapecó - UNOCHAPECÓ (local de realização do experimento) antes dos procedimentos experimentais. No biotério, o macro-ambiente era semi-controlado, com foto-período de 12 horas. Os animais foram alimentados com dieta padrão de água e ração *ad libitum*.

Obedecendo aos padrões do local de experimentação, as caixas de acondicionamento, a água e a ração fornecida foram autoclavadas.

4.3 Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes experimental foi efetuada em 36 animais, aleatoriamente escolhidos, através da administração de 42mg/kg, por via endovenosa, de mono-hidrato de aloxana (SIGMA-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA, lote 083K2511), diluído em solução salina estéril (LIMA *et al.*, 2001; LERCO *et al.*, 2003).

Para a indução do diabetes, os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas, com fornecimento de água *ad libitum*. Ao término desse período foram colocados em uma caixa aquecida por uma lâmpada incandescente a uma temperatura na faixa de 40°C, durante um período de 10 minutos, para permitir uma melhor visualização das veias caudais. Foram pesados e em seguida anestesiados, com a administração, por via intramuscular, de cloridrato de quetamina a 10%, na dose de 1g/kg de peso corpóreo, associado ao cloridrato de xilazina a

2%, na dose de 0,02g/kg de peso corpóreo (MASSONE, 2003). As drogas anestésicas foram aplicadas de forma independente, com a utilização de seringas de 1ml de capacidade e agulhas de 8 x 0,30mm. Esse procedimento anestésico foi adotado como padrão no presente estudo e foi utilizado em todos os momentos onde se fez necessário.

A solução de aloxana foi administrada lentamente, por via endovenosa, em uma das veias da cauda.

Decorridos 30 minutos, os animais foram novamente acondicionados em caixas e normalmente alimentados. Os ratos receberam uma solução de glicose a 10% como única fonte hídrica, por um período de 24h. Essa manobra, segundo Mazzanti *et al.* (2003) previne a mortalidade nos primeiros momentos pós-indução do diabetes experimental.

No presente estudo, dos 36 animais submetidos à indução do diabetes, um rato foi a óbito durante os procedimentos de indução (2,8%) e outros seis ratos durante os primeiros seis dias pós-indução (16,7%). Dos 29 animais restantes, 11 animais foram descartados do estudo por não atingirem níveis de glicemia sanguínea considerados adequados para a caracterização do diabetes dentro dos parâmetros pré-estabelecidos (glicemia menor do que 180 mg/dl) (MAZZANTI *et al.*, 2003).

Os 18 animais restantes foram divididos em três grupos experimentais, cada qual composto de seis animais. A tabela 3 mostra o comportamento da glicemia sanguínea e do peso dos animais durante o período de indução do diabetes.

Tabela 3 - Evolução da glicemia sanguínea e do peso dos animais durante o período de indução do diabetes.

Grupo experimental	Glicemia sanguínea (mg/dl)	Peso (g)
Diabético (inicial – dia da indução)	70,76 ± 12,94	256,97 ± 22,39 (n = 36)
Diabético (após sete dias)	175,32 ± 30,91	233,59 ± 28,25 (n = 29)
Controle (inicial)	73,28 ± 13,44	252,67 ± 15,47 (n = 18)
Controle (após sete dias)	75,39 ± 14,20	261,44 ± 11,63 (n = 18)

O período de indução do diabetes experimental foi de sete dias, desde a administração da aloxana até a formação dos grupos experimentais.

4.3.1 Determinação dos níveis de glicemia sanguínea

A medida dos níveis de glicemia sanguínea foi efetuada em todos os animais, em três momentos distintos. O primeiro momento foi imediatamente antes da indução, o segundo

depois de decorridos sete dias (momento de estabelecimento das lesões cutâneas) e o último no 14º dia (período de sacrifício dos animais).

Para coleta do sangue e determinação dos níveis glicêmicos, em todos os momentos, os animais ficaram em jejum de 12 horas, recebendo apenas fonte hídrica durante esse período. Em todas as coletas, os animais foram previamente anestesiados de acordo com o procedimento padrão adotado neste estudo e citado anteriormente.

No primeiro e no sétimo dias a coleta de sangue se deu pela punção do plexo venoso retro-orbital com a utilização de um tubo capilar de vidro para coleta de hematócrito (WAYNFORTH; FLECKNELL, 2004). O sangue coletado foi acondicionado em tubos coletores de 4ml modelo Vacuette® - VACUETTE DO BRASIL LTDA, revestidos internamente com acelerador de coágulo (SiO_2) e com gel separador. A última coleta foi realizada por punção cardíaca (WAYNFORTH; FLECKNELL, 2004), haja vista que nesse momento os animais foram sacrificados.

O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação e a dosagem imediata da glicose foi realizada no mesmo pelo método enzimático-colorimétrico da glicose-oxidase.

4.4 Distribuição dos grupos experimentais

Para as avaliações propostas no presente estudo, os 36 animais selecionados foram divididos em seis grupos experimentais, com seis animais cada (três grupos de ratos diabéticos e três grupos de não diabéticos). Os 18 animais diabéticos e os 18 animais não diabéticos foram divididos em grupos compostos por seis animais não tratados, seis animais tratados com LED e seis animais tratados com laser (Fig. 10).

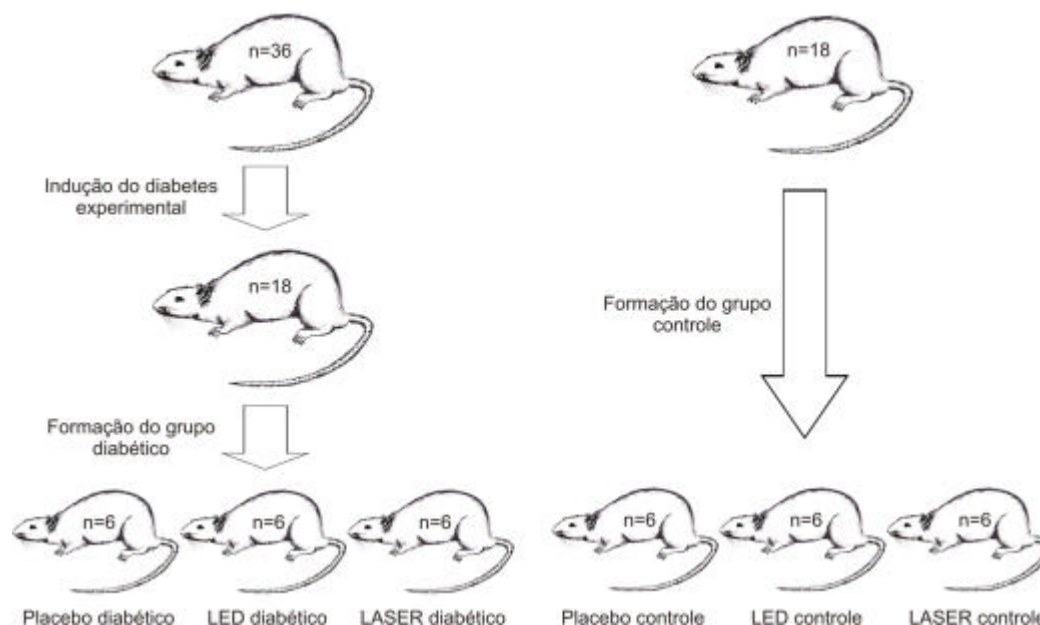


Figura 10 - Distribuição dos grupos experimentais.

O grupo diabético e o grupo controle foram compostos de animais com lesão dorsal e sem fototerapia, denominados de animais placebo, animais com lesão dorsal e submetidos à fototerapia com a utilização de laser (InGaIP – 660nm) denominados de LASER e animais com lesão dorsal e fototerapia com LED ($640 \pm 20\text{nm}$) denominados de LED. A tabela 4 exemplifica a distribuição dos animais nos grupos experimentais:

Tabela 4 - Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos (n = 6)	Ferida cutânea	Não diabético	Diabético	LED	Laser
Placebo controle	X	X			
LED controle	X	X		X	
LASER controle	X	X			X
Placebo diabético	X		X		
LED diabético	X		X	X	
LASER diabético	X		X		X

4.5 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico visou estabelecer lesões cutâneas circunferenciais em todos os animais.

Previamente ao procedimento, os animais foram anestesiados e os pêlos do seu dorso foram tricotomizados. A tricotomia foi realizada inicialmente com uma máquina elétrica e

complementada com uma lâmina de aço inoxidável (lâmina de barbear) acoplada a um navalhete. A figura 11 representa o procedimento.



Figura 11 - Tricotomia e assepsia do dorso dos animais .

Após a realização da tricotomia, foi realizada a assepsia do local com uma gaze esterilizada levemente embebida numa solução de gluconato de clorexidina a 2% e cada animal foi submetido a uma lesão cutânea única, executada no lado direito do dorso com um *punch* cirúrgico descartável de 0,8 cm de diâmetro. A figura 12 representa a seqüência de procedimentos.

Todos os animais foram submetidos a uma lesão circunferencial, com área de $0,5 \text{ cm}^2$, no lado direito do seu dorso. A área da lesão foi calculada pela equação matemática: $\text{área} = \pi \cdot r^2$, onde o raio da lesão (r) foi de 0,4 cm e correspondeu à metade do diâmetro do *punch* utilizado, que media 0,8 cm.



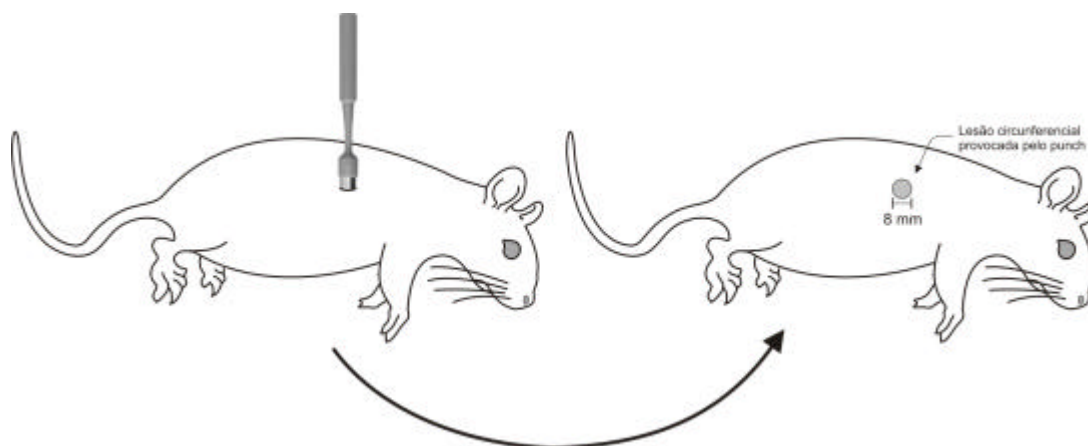


Figura 12 - Procedimento cirúrgico de estabelecimento das lesões dorsais.

Ao término do procedimento cirúrgico, cada animal foi acondicionado em uma caixa autoclavada, identificada com a hora exata do estabelecimento da lesão.

4.6 Fototerapia

A fototerapia objetivou fornecer à área lesionada uma densidade de energia (DE) de 6 J/cm^2 , em uma única aplicação, 30 minutos após o estabelecimento da lesão, com a utilização de duas fontes emissoras diferentes: uma fonte laser de fosfeto de índio, gálio e alumínio (InGaAlP), emitindo de forma contínua em um comprimento de onda de 660 nm e com uma potência de saída de 30 mW ou uma fonte LED, com um diodo emissor de luz emitindo na faixa espectral de $640 \pm 20 \text{ nm}$ e potência de saída de 30 mW.

A fototerapia foi realizada em quatro grupos de animais (LED controle, LASER controle, LED diabético e LASER diabético). Nos grupos placebo (placebo controle e placebo diabético) não foi realizada fototerapia, contudo, os animais foram igualmente manipulados para que não se produzisse nenhum viés em relação aos demais grupos.

4.6.1 Equipamentos utilizados

O equipamento laser utilizado foi um modelo produzido em escala industrial para Fisioterapia (Endophoton® LLT 0107 – KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda.) e o equipamento LED foi produzido no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP especificamente para este estudo. A figura 13 ilustra os equipamentos e as suas especificações.



Figura 13 - Equipamentos utilizados na fototerapia.

A potência de emissão dos equipamentos foi verificada com a utilização do dispositivo Integrated 2-Watt Broadband Power and Energy Meter System - 13 PEM 001/J (Melles Griot Photonics Components Group - Carlsbad, California 92011, USA). O equipamento é ilustrado na figura 14.



Figura 14 - Equipamento utilizado para a aferição da potência das fontes emissoras.

4.6.2 Fototerapia nos grupos LASER (LASER controle e LASER diabético)

A lesão circunferencial de área igual a $0,5 \text{ cm}^2$ foi irradiada, 30 minutos após o seu estabelecimento, com a utilização de uma fonte laser contínua de fosfeto de índio, gálio e alumínio (InGaAlP – 660nm). A área do feixe do laser era de $0,035 \text{ cm}^2$. O equipamento foi afastado em 1 cm de distância da lesão, de modo que, através da análise da divergência de emissão do feixe pudesse cobrir toda a área da mesma.

A densidade de energia preconizada foi de 6 J/cm^2 , e portanto o tempo de irradiação foi calculado em 100 segundos.

Cada animal foi acondicionado em um suporte articulável que permitiu o posicionamento adequado do mesmo sob a fonte emissora. A lesão foi recoberta com um filme de PVC transparente para evitar a contaminação cruzada.

4.6.3 Fototerapia nos grupos LED (LED controle e LED diabético)

Nestes grupos, a irradiação da lesão foi efetuada 30 minutos após o seu estabelecimento com a utilização de uma fonte LED emitindo na faixa espectral de $640 \pm 20\text{nm}$, potência de saída de 30 mW e diâmetro do feixe a 1 cm de distância de $0,5\text{ cm}^2$.

O equipamento foi acoplado a um suporte de altura regulável e na sua extremidade foi adaptado um distanciador, também denominado de *stopper*, afastando-o em 1 cm do local de irradiação, para que a área focal do feixe emitido pelo equipamento correspondesse exatamente com a área da lesão.

A DE utilizada foi de 6 J/cm^2 e o tempo de irradiação foi calculado em 100 segundos.

4.7 Coleta de dados para a análise macroscópica

Após o estabelecimento das lesões, as mesmas foram fotografadas diariamente, durante o período de sete dias, com a utilização de uma câmera de captura de foco fixo, modelo Moticom[®] 2300 (Motic, British Columbia, Canada), com resolução de três megapixels e com o acessório tubo acrílico acoplado à objetiva e uma régua milimetrada posicionada na sua base (figura 15).



Figura 15 - Câmera digital Moticam® 2300 com acessórios.

As fotografias diárias e a observação clínica visual das feridas objetivaram a análise biométrica do diâmetro das lesões e das características da crosta.

A presença de crosta foi atribuída à visualização da mesma sobre a lesão, mesmo que estivesse em fase de descolamento. A ausência de crosta foi definida como a inexistência de qualquer cobertura sobre a lesão.

A análise do diâmetro da lesão foi efetuada com a utilização do programa ImageJ. Este programa foi calibrado para cada fotografia analisada. A opção pelo mesmo foi pelo fato de possuir utilização livre e gratuita.

Os procedimentos foram os seguintes: Após a calibração do programa, utilizou-se a ferramenta *point selections* e demarcaram-se 12 pontos equidistantes em toda a circunferência da lesão. Em seguida utilizou-se o comando *selections – fit ellipse* para unir esses pontos. Com o comando *measure* obteve-se o diâmetro de Ferret da ferida, definido como o comprimento da projeção do maior perfil da ellipse criada a partir da união dos pontos demarcados no bordo da lesão sobre uma linha de referência (HINDS;MCNELLY, 1982). Como as feridas apresentavam formato elíptico, o diâmetro de Ferret obtido pelo programa ImageJ foi o maior diâmetro da ellipse. A figura 16 demonstra a obtenção da medida do mesmo.

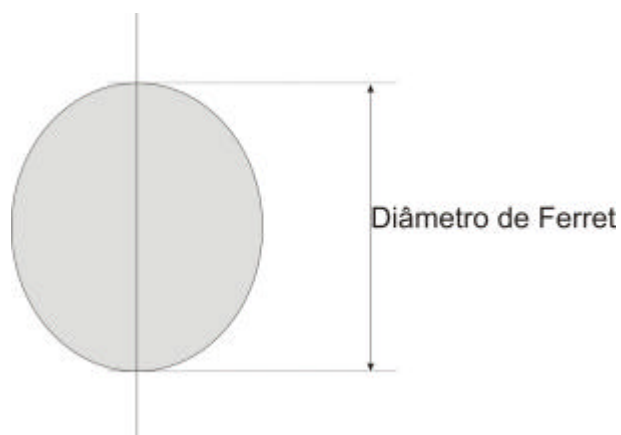
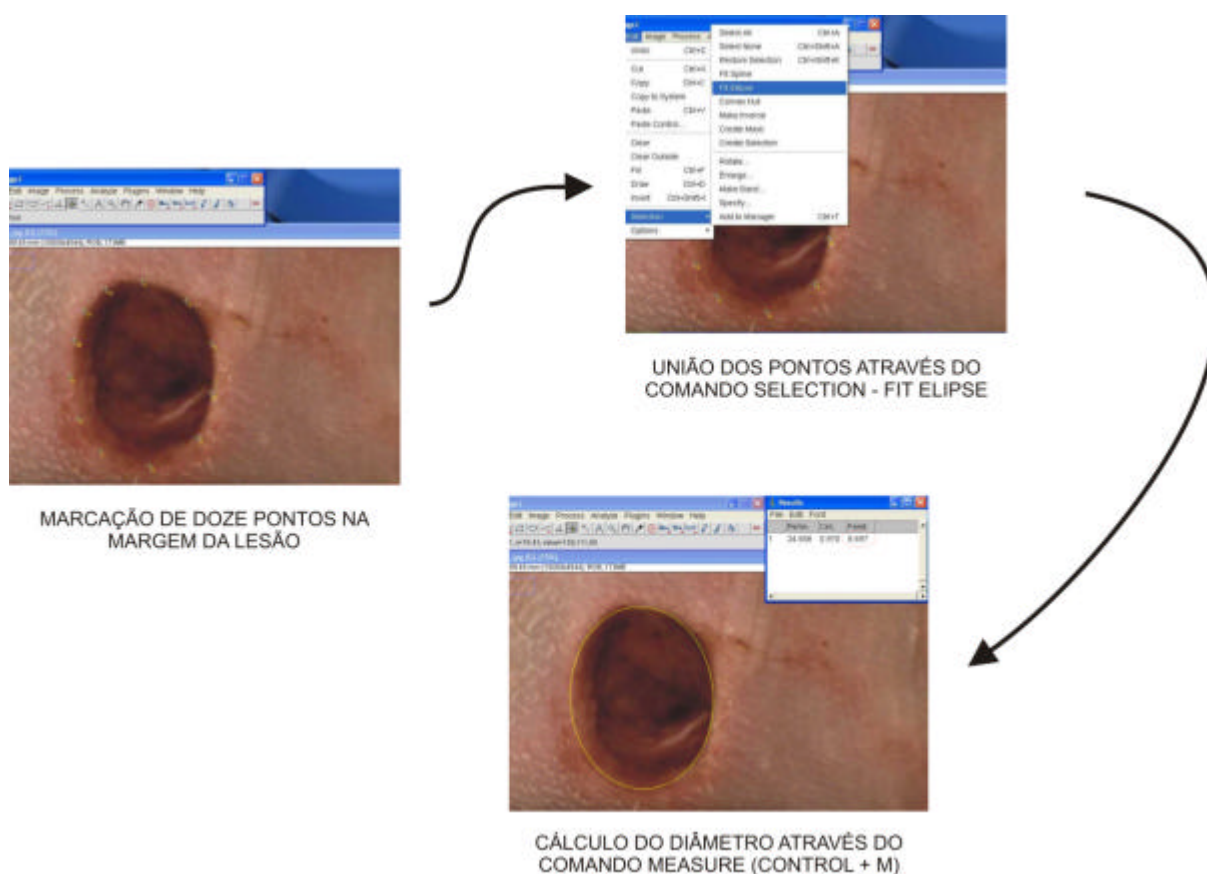


Figura 16 - Figura representativa do diâmetro de Ferret obtido na elipse formada pelo contorno das feridas.

Os procedimentos executados no programa ImageJ são descritos na seqüência de imagens na figura 17.



Procedimentos executados no programa ImageJ para obter o valor do diâmetro das feridas.

4.8 Coleta de dados para a análise microscópica

Após sete dias do estabelecimento das lesões cutâneas, os animais foram sacrificados e o tecido da área correspondente à lesão foi excisionado com a utilização de uma lâmina de bisturi nº 15 montada em um cabo nº 3. A peça foi removida com um formato losangular, de modo a preservar 0,5 cm de margem livre em todo o contorno da lesão. Esse procedimento permitiu que durante a macroscopia a peça removida fosse seccionada no sentido correspondente ao menor diâmetro do losango, determinando que, posteriormente, os cortes histológicos efetuados corresponderem sempre à região mediana da lesão e sempre do mesmo plano anatômico do animal. O procedimento de excisão em forma de losango é ilustrado na figura abaixo:

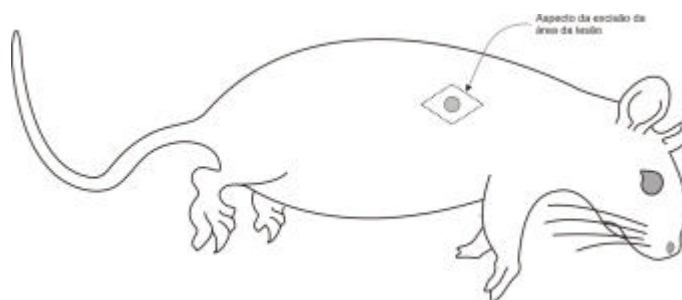


Figura 17 - Ilustração da forma de excisão dos tecidos para análise histológica.

O tecido removido foi acondicionado em um cassete histológico identificado e imediatamente colocado em um recipiente contendo formalina tamponada a 10%.

Os tecidos permaneceram na formalina por um período de 24h e ao término deste foram submetidos ao processamento histológico automatizado. Após foram emblocados em parafina, submetidos à microtomia, obtendo-se cortes de 3µm de espessura, e corados através do método HE (hematoxilina/eosina). As lâminas histológicas permanentes foram submetidas à análise por microscópica de luz e à captura digital, para posterior análise estereológica. A captura das imagens foi efetuada através de uma câmara digital da marca Leica®, com resolução de 1280 X 1024 pixels e acoplada a um microscópio trinocular. As fotomicrografias foram obtidas com o uso de objetivas de 4, 10, 20 e 40 vezes e as imagens armazenadas no formato TIFF (Tagged Image File Format). A figura 19 demonstra o equipamento utilizado.



Figura 18 - Fotografia do equipamento de captura digital.

Microscopicamente foram analisados parâmetros quantitativos e qualitativos. A análise histomorfométrica (quantitativa) compreendeu a contagem de células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos. A análise histomorfológica (qualitativa) compreendeu a avaliação da evolução do reparo das lesões.

4.8.1 Análise histomorfológica

A análise histomorfológica foi efetuada segundo o proposto por Yu *et al.* (1997). Os parâmetros avaliados envolveram aspectos qualitativos relacionados à evolução do processo de reparo da lesão como um todo, englobando as modificações morfológicas dos tecidos que compõe a epiderme e a derme e pela observação do grau de epitelização, conteúdo celular (tipo e formato), presença e constituição do tecido de granulação, padrão de deposição do colágeno e características da vascularização. Dependendo desses parâmetros, foram atribuídos graus à evolução no reparo de cada lesão. A tabela 5 demonstra os critérios utilizados.

Tabela 5 - Demonstração dos parâmetros avaliados na análise histomorfológica propostos por (YU *et al.*, 1997).

Grau	Parâmetro avaliado	Critério
1 a 3	Epitelização	Nenhuma ou mínima
	Conteúdo celular	Nenhuma ou mínima (principalmente para células inflamatórias)
	Tecido de granulação	Nenhum ou esparso nas bordas da ferida
	Deposição de colágeno	Nenhuma
	Vascularização	Nenhuma
4 a 6	Epitelização	Mínima (menos da metade do diâmetro da ferida). Moderada (mais de
	Conteúdo celular	Predominantemente inflamatórias. Poucos fibroblastos
	Tecido de granulação	Nenhum ou delgada camada no centro do ferimento. Espesso nas
	Deposição de colágeno	Poucas fibras de colágeno
	Vascularização	Poucos capilares
7 a 9	Epitelização	Completamente epitelizado. Camada delgada
	Conteúdo celular	Mais fibroblastos. Ainda com células inflamatórias
	Tecido de granulação	7 - Escasso no centro da lesão. Principalmente tecido adiposo abaixo
		8 - Delgada camada no centro da lesão e poucas fibras colágenas
		9 - Camada mais espessa, com mais colágeno
10 a 12	Vascularização	Moderada vascularização
	Epitelização	Camada de epitélio mais espesso
	Conteúdo celular	Predominância de fibroblastos
	Tecido de granulação	Uniformemente espesso
	Deposição de colágeno	Deposição moderada a extensa de colágeno, porém menos
13 a 15	Vascularização	Extensa neovascularização
	Epitelização	Espesso
	Conteúdo celular	Menor número de fibroblastos na derme
	Tecido de granulação	Uniformemente espesso
	Deposição de colágeno	Denso, organizado e com fibras orientadas paralelamente (feixes)
	Vascularização	Sistema capilar bem definido

A análise histomorfológica foi efetuada por um mesmo observador em dois momentos diferentes, separados temporalmente por um período de quinze dias, com a finalidade de diminuir possíveis vieses. Nos dois momentos, os cortes histológicos, correspondentes à região mediana das lesões, foram analisados no microscópio de luz onde o observador possuía liberdade para percorrer os campos e modificar os aumentos no equipamento.

A observação se deu mediante um teste cego e de forma aleatória. Para isso a identificação das lâminas foi ocultada com uma fita adesiva e o valor numérico, referente ao grau histológico atribuído na análise, era anotado sobre a mesma.

Após o primeiro momento de análise, as fitas adesivas foram removidas e os valores numéricos foram transcritos para uma tabela com a respectiva associação ao animal correspondente. Esse procedimento permitiu que, durante o segundo momento de análise, todos os procedimentos fossem repetidos, garantindo a execução do teste cego e de forma aleatória.

4.8.2 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica das fotomicrografias utilizou-se o programa ImageJ associado ao *plugin Cell Counter*.

A quantificação de células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos foi efetuada no programa com a sequência de comandos: calibração do programa, carregamento da fotomicrografia no programa ImageJ. Utilização do comando *rectangular selections*, seguido dos comandos *edit – selection – specify* determinando uma área de análise da fotomicrografia (com o programa previamente calibrado a área pode ser determinada com precisão e correspondeu a $271.699 \mu\text{m}^2$ – 400 x 400 pixels). Utilização do comando *image – crop* (Ctrl + Shift + X) e corte da área a ser analisada com a criação de uma nova imagem. Utilização do *plugin cell counter* e realização da contagem manual das células ou dos vasos de interesse. A figura 20 demonstra a sequência descrita.

Foram efetuadas duas contagens para cada corte histológico. Uma em cada região considerada da derme, superficial e profunda.

4.9 Análise estatística

Para verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foi definido um valor de $p < 0,05$ como determinante de significância estatística.

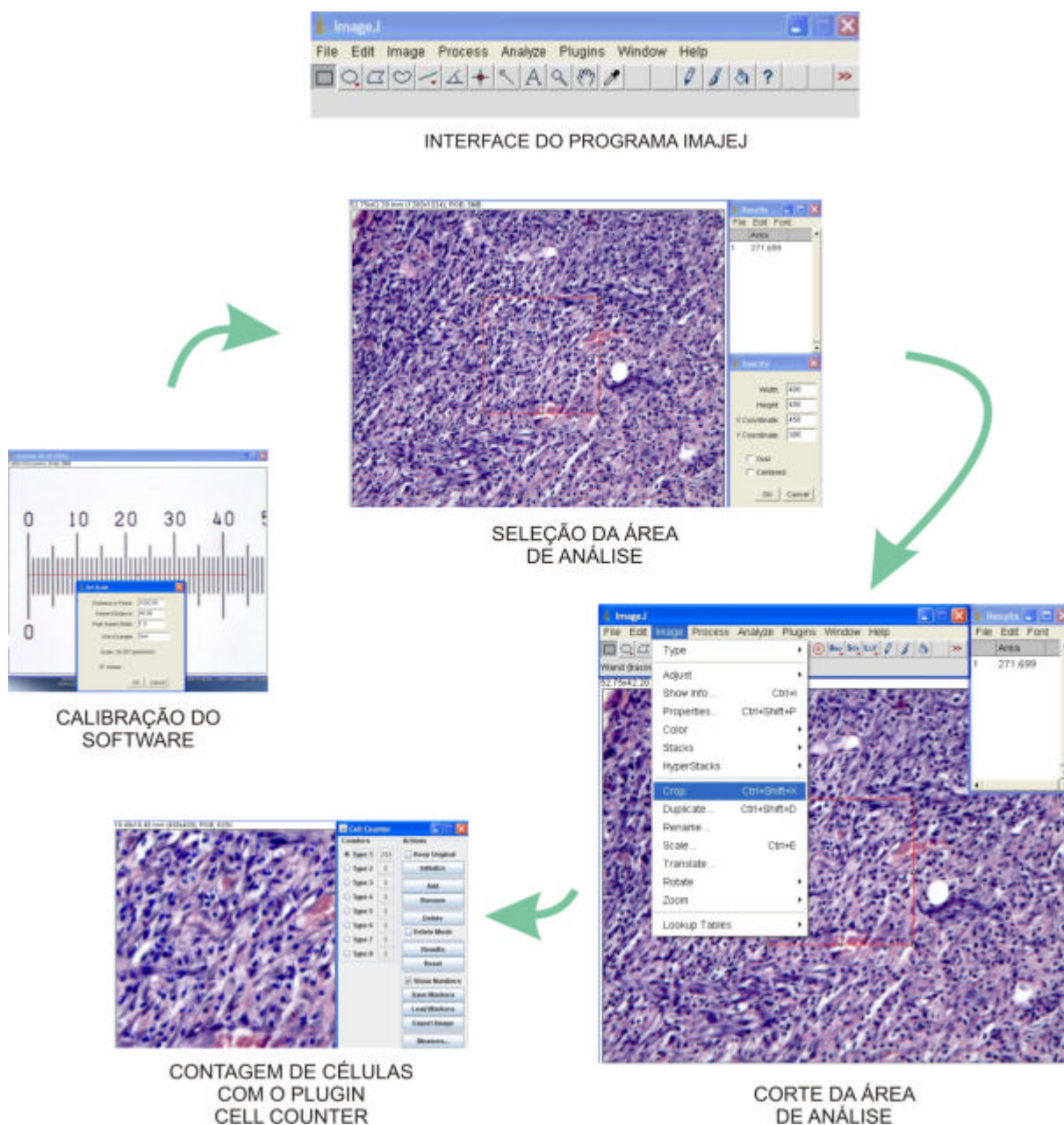


Figura 19 - Ilustração da sequência de comandos executados no programa ImageJ para quantificação dos parâmetros histológicos e análise histomorfométrica.

5 RESULTADOS

O presente estudo compreendeu um período de 14 dias, considerados desde a indução do diabetes até o sacrifício dos animais.

No decorrer do período experimental, os seguintes resultados puderam ser observados:

5.1 Evolução clínica e laboratorial dos animais

A observação visual diária, somada à verificação da glicemia sanguínea e do peso dos animais em momentos pré-determinados permitiu o monitoramento da evolução clínica e laboratorial dos mesmos. Os resultados são referentes à verificação do peso e da glicemia sanguínea em três momentos distintos: no início do experimento (dia da indução do diabetes), após sete dias (dia do procedimento cirúrgico) e no 14º dia, que correspondeu ao momento do sacrifício.

O peso dos animais no início do experimento variou entre 211g e 291g, com uma média aproximada de 250g (Tabela 6). Essa média teve dois comportamentos distintos nos diferentes grupos experimentais, demonstrando-se significativamente aumentada no grupo controle, no período de 14 dias ($p < 0,01$). Em contrapartida, o grupo diabético possuiu uma diminuição do peso, com diferenças significativas no sétimo e décimo quarto dias ($p < 0,001$ para ambos).

Tabela 6 - Evolução do peso dos animais durante o estudo.

Grupo experimental	Peso inicial - dia da indução (g)	Após sete dias - Peso no dia da lesão (g)	Após 14 dias - Peso no dia do sacrifício (g)
Controle	252,67 ± 15,47 (n = 18)	261,44 ± 11,63 (n = 18)	275,28 ± 10,83 (n = 18) ^A
Diabético	256,97 ± 22,39 (n = 36)	235,22 ± 19,65 (n = 18) ^B	228,75 ± 12,87 (n = 14) ^{B,C}

Comparação entre os grupos controle e diabético. Valores expressos em média ± desvio padrão. ^A = $p < 0,01$ em relação ao grupo controle inicial (dia da indução), ^B = $p < 0,001$ em relação ao grupo controle no mesmo período e ao grupo diabético inicial (dia da indução), ^C = em relação ao grupo diabético no dia da lesão (ANOVA + Bonferroni).

A glicemia sanguínea mensurada também revelou um comportamento distinto nos grupos controle e diabético.

Os ratos do grupo controle apresentaram, em todos os momentos de verificação, níveis de glicemia sanguínea compatíveis com os preconizados para animais sadios, que variam entre 75 e 99 mg/dl (LOPES *et al.*, 2007). Em contrapartida, os ratos portadores de diabetes

induzido apresentaram uma elevação da glicemia sanguínea que foi significativa aos sete e aos 14 dias ($p < 0,001$). (Tabela 7 e Figura 21).

Tabela 7 - Evolução da glicemia sanguínea dos animais durante o estudo.

Grupo experimental	Glicemia inicial – dia da indução (mg/dl)	Após sete dias - Glicemia no dia da lesão (mg/dl)	Após 14 dias - Glicemia no dia do sacrifício (mg/dl)
Controle	73,28 ± 13,44 (n = 18)	75,39 ± 14,20 (n = 18)	77,43 ± 15,43 (n = 18)
Diabético	70,76 ± 12,94 (n = 36)	194,68 ± 11,84 (n = 18) ^{A, B}	189,50 ± 7,84 (n = 14) ^{A, B}

Comparação entre os grupos controle e diabético. Valores expressos em média ± desvio padrão.
^A = $p < 0,001$ em relação ao grupo controle no mesmo período, ^B = $p < 0,001$ em relação ao grupo diabético inicial (dia da indução) (ANOVA + Bonferroni).

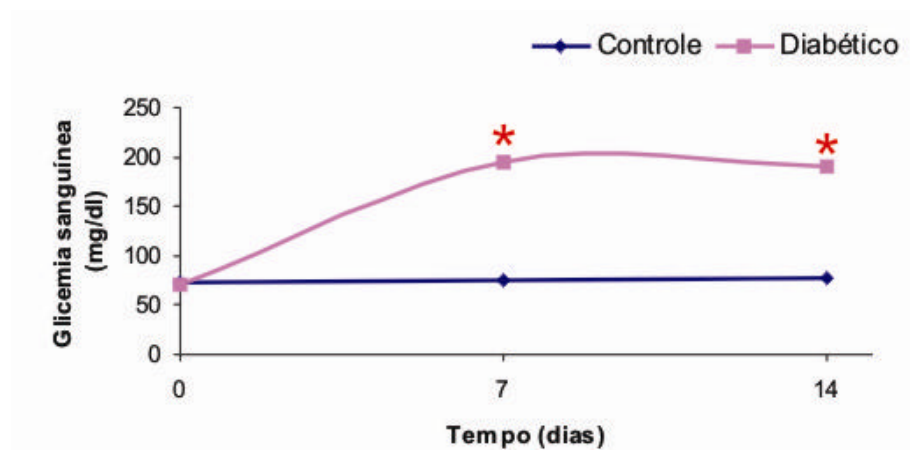


Figura 20 - Gráfico demonstrativo da evolução da glicemia sanguínea dos grupos experimentais durante o estudo em função do tempo. * = $p < 0,001$.

5.2 Evolução do reparo das feridas – análise macroscópica

A análise biométrica das fotografias das lesões permitiu a avaliação da evolução do diâmetro das feridas e a análise das características da crosta.

5.2.1 Diâmetro das feridas

Os resultados apresentados são referentes ao diâmetro das feridas, avaliado nas 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas pós-cirurgia.

A análise intergrupos revelou que o diâmetro foi significativamente menor nos grupos submetidos à fototerapia. As diferenças foram mais evidentes no grupo diabético do que no grupo controle.

A redução do diâmetro das feridas no período de 168 horas pós-cirurgia foi de 39,3% no grupo placebo controle, 50,5% no grupo LED controle e de 51,1% no grupo LASER controle. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos LED controle e LASER controle em relação ao grupo placebo controle ($p<0,05$).

Para o grupo diabético, a redução do diâmetro foi de 30,1% no grupo placebo, de 45% no grupo LED e de 44,5% no grupo LASER. Houve diferença estatisticamente significativa para ambos os grupos: LED diabético e LASER diabético em relação ao grupo placebo diabético ($p<0,01$). A tabela 8 e a figura 22 demonstram essa relação.

Tabela 8 - Evolução do diâmetro das feridas nos grupos experimentais durante o estudo.

Tempo pós-cirurgia (h)			24	48	72	96	120	144	168
Grupo Não diabético (Controle)	Placebo	Med	7,95	7,41	6,97	6,51	5,89	5,61	4,83
		DP	0,09	0,36	0,32	0,31	0,49	0,50	0,55
	LED	Med	7,70	7,12	6,20	5,77	5,11	4,82	3,82
		DP	0,61	0,64	0,35	0,27	0,42	0,50	0,51
	LASER	Med	7,74	7,17	6,34	5,85	5,25	4,89	3,79
		DP	0,36	0,36	0,27	0,31	0,45	0,40	0,53
Grupo Diabético	Placebo	Med	8,29	7,82	7,59	7,23	6,70	6,31	5,79
		DP	0,30	0,66	0,30	0,37	0,35	0,50	0,50
	LED	Med	7,85	7,39	6,30	6,16	5,80	5,24	4,32
		DP	0,41	0,36	0,14	0,13	0,41	0,53	0,15
	LASER	Med	7,91	7,71	6,70	6,31	5,89	5,26	4,39
		DP	0,31	0,73	0,59	0,50	0,61	0,57	0,36

Med = média

DP = Desvio padrão

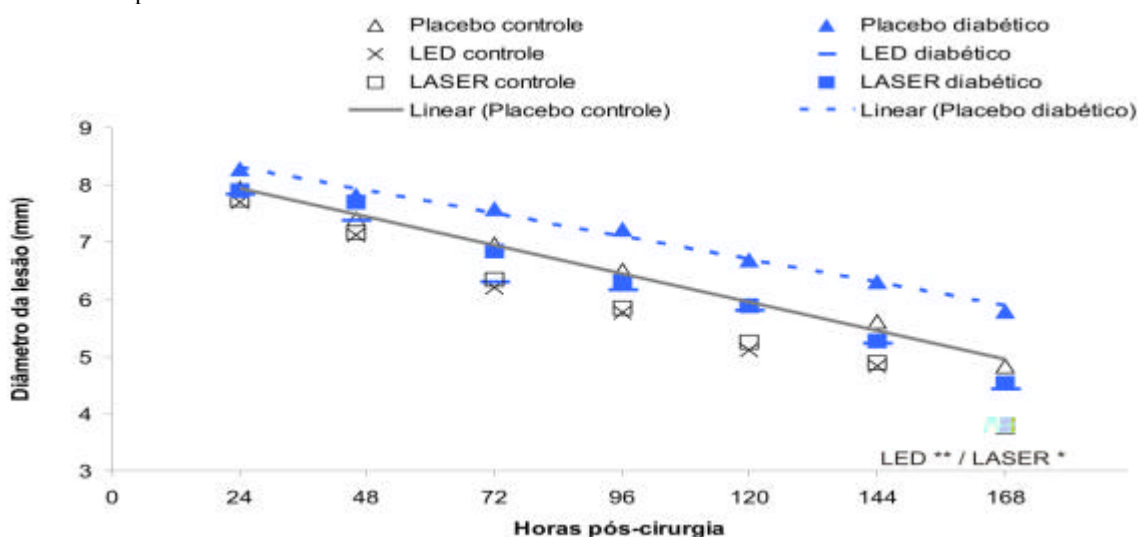


Figura 21 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas dos grupos experimentais durante o estudo em função do tempo.

LED ** / LASER * = LED diabético e LASER diabético em relação ao placebo diabético ($p<0,01$) e LED controle e LASER controle em relação ao placebo controle ($p<0,05$) (ANOVA + Bonferroni).

A análise intragrupos demonstrou que em todos os grupos houve uma redução estatisticamente significativa do diâmetro das feridas no período de 24 para 168 horas ($p<0,001$).

Observou-se também uma diferença estatisticamente significativa na redução do diâmetro das feridas no período entre 144 e 168 horas para o grupo LED controle ($p<0,05$) e LASER controle ($p<0,01$).

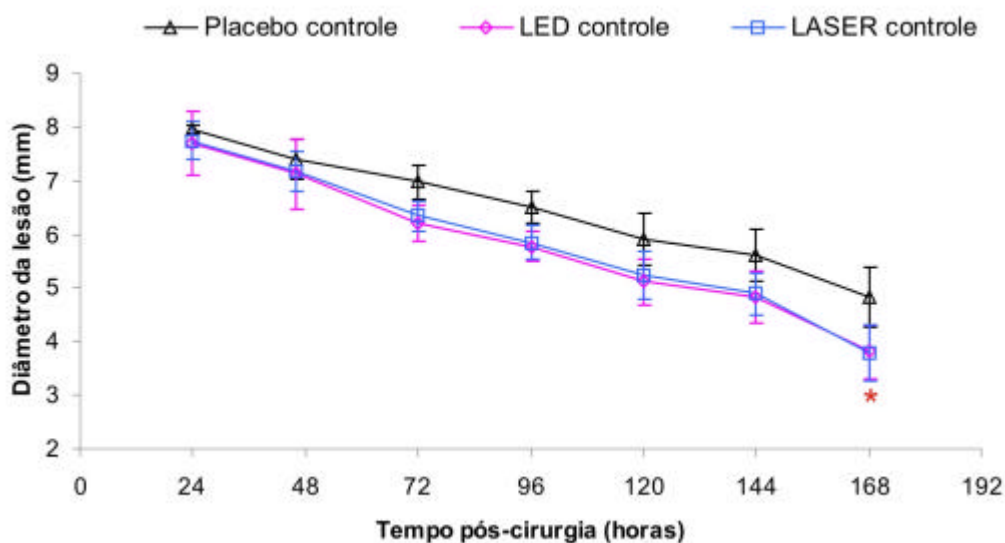


Figura 22 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas do grupo controle durante o estudo em função do tempo.

* = LED controle e LASER controle em relação ao placebo controle ($p<0,05$) (ANOVA + Bonferroni).

O grupo LED diabético, comparado ao grupo placebo diabético apresentou uma diferença estatisticamente significativa na redução do diâmetro das feridas no período de 72 horas.

No período de 168 horas pós-cirurgia, os grupos LED diabético e LASER diabético mostraram uma redução significativa no diâmetro das feridas em comparação ao grupo placebo diabético ($p<0,01$).

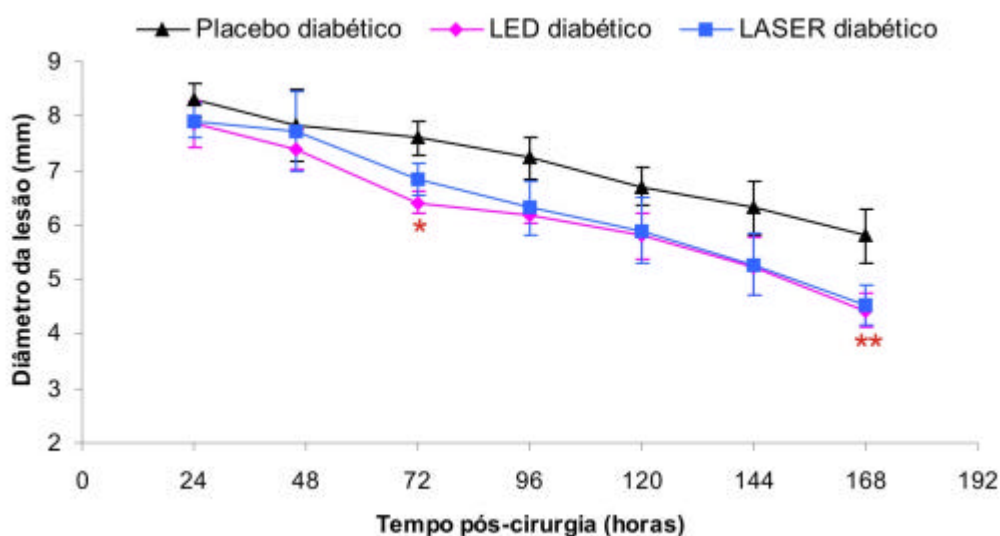


Figura 23 - Gráfico demonstrativo da evolução do diâmetro das feridas do grupo diabético durante o estudo em função do tempo.

* = LED diabético em relação ao placebo diabético ($p < 0,05$). ** = LED diabético e LASER diabético em relação ao placebo diabético (ANOVA + Bonferroni).

5.2.2 Características da crosta

A análise da presença de crosta nas feridas dos animais é representada pela frequência de aparecimento da mesma nos grupos experimentais em função do tempo. A figura 25 demonstra a dinâmica.

A crosta apareceu sobre as lesões dos animais nas 48h seguintes ao procedimento cirúrgico. Nesse momento observou-se que 50% do grupo placebo controle já possuíam crosta formada, contra 20% do grupo placebo diabético. Nas 72h subseqüentes ao estabelecimento das lesões todos os animais apresentaram crosta formada sobre as mesmas.

Os animais submetidos à fototerapia apresentaram uma formação mais precoce da crosta se comparados aos animais não tratados. Esta apareceu nas 48 h em 66,7% dos animais dos grupos LED controle e LASER controle e em 50% dos animais do grupo LED diabético e em 20% dos animais do grupo LASER diabético.

A perda da crosta começou a ser observada à partir das 120h dos grupos LED controle e LASER controle. Nos grupos LED diabético, LASER diabético e placebos o início da perda da crosta pode ser observado tardiamente, apenas depois das 144 h. Os dados são mostrados na tabela 9 e figura 25.

Tabela 9 - Evolução do diâmetro das feridas nos grupos experimentais durante o estudo.

Tempo pós-cirurgia (h)		24	48	72	96	120	144	168
Grupo Não diabético (Controle)	Placebo	0,0	50,0	66,7	100,0	100,0	83,3	66,7
	LED	0,0	66,7	83,3	100,0	83,3	66,7	50,0
	LASER	0,0	66,7	83,3	100,0	83,3	66,7	50,0
Grupo Diabético	Placebo	0,0	20,0	80,0	100,0	100,0	80,0	80,0
	LED	0,0	50,0	100,0	100,0	100,0	75,0	50,0
	LASER	0,0	20,0	80,0	100,0	100,0	100,0	60,0

Valores expressos em %.

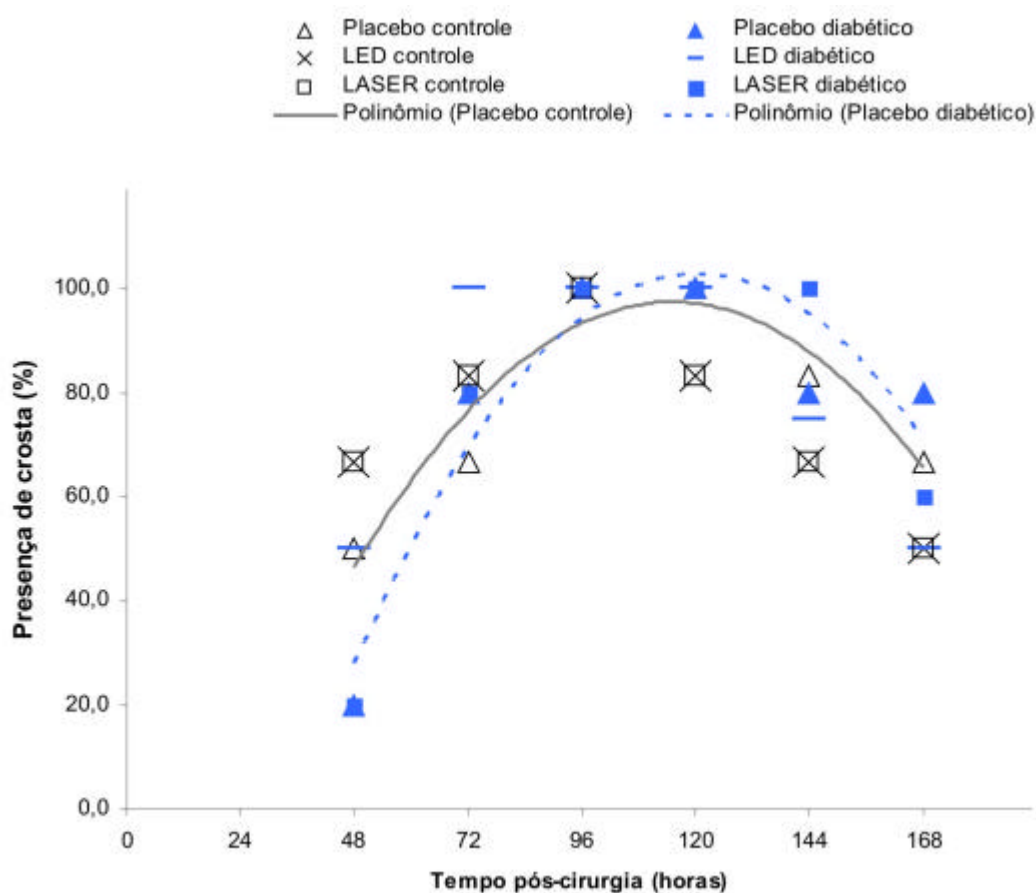


Figura 24 - Presença de crosta pós-cirurgia nos animais de diferentes grupos experimentais.

5.3 Evolução do reparo das feridas – análise histomorfológica

Os resultados da análise histomorfológica (qualitativa) representam os critérios propostos por Yu *et al.* (1997). As médias dos valores numéricos atribuídos estão expressas na tabela 8.

Tabela 10 - Representação numérica da análise histomorfológica dos vários grupos estudados.

Grupo experimental	Grau histológico atribuído
Placebo controle	5,58 ± 0,66
LED controle	7,75 ± 0,80
LASER controle	7,83 ± 0,54
Placebo diabético	3,40 ± 0,19
LED diabético	6,38 ± 0,24 *
LASER diabético	6,20 ± 0,51 *

Representação numérica da média ± erro referentes aos graus atribuídos na análise qualitativa proposta por Yu *et al.*, (1997) para a evolução do reparo das feridas. * = (p<0,05) em relação ao grupo placebo diabético (ANOVA + Bonferroni). Valores representados pela média ± erro.

O grupo placebo controle apresentou valores compatíveis com uma epitelização moderada (mais da metade do diâmetro da ferida), predomínio de células inflamatórias bem evidentes e em áreas extensas da derme, principalmente na região superficial. Uma delgada camada de tecido de granulação ao centro do ferimento, mais espesso nas bordas, poucas fibras colágenas e poucos capilares sanguíneos. Comparativamente a esse grupo, os grupos LED controle e LASER controle apresentaram completa epitelização, representada por uma delgada camada de tecido epitelial, predomínio de fibroblastos ao infiltrado inflamatório e presença de tecido de granulação escasso no centro da lesão, acompanhado de poucas fibras colágenas e às vezes com tecido adiposo abaixo do epitélio. Nestes grupos a vascularização apresentou-se moderada, com presença de vasos congestos e dilatados.

O grupo placebo diabético não apresentou nenhuma ou uma mínima epitelização, um conteúdo celular predominante para células inflamatórias com discreta vascularização e ausência de fibras colágenas. Os grupos tratados (LED diabético e LASER diabético) apresentaram características histológicas indicativas de aceleração do processo de reparo quando comparados ao grupo placebo diabético. A epitelização apareceu recobrando metade ou menos do diâmetro da ferida na maioria dos casos. O infiltrado inflamatório foi freqüente, porém menos intenso que no grupo placebo diabético. Puderam ser evidenciados fibroblastos em processo de proliferação, poucas fibras colágenas e uma presença discreta de vasos sanguíneos.

As características histológicas indicaram uma aceleração da cicatrização pela fototerapia, mais evidente nos grupos de animais tratados com LED e LASER se comparados aos animais do grupo controle.

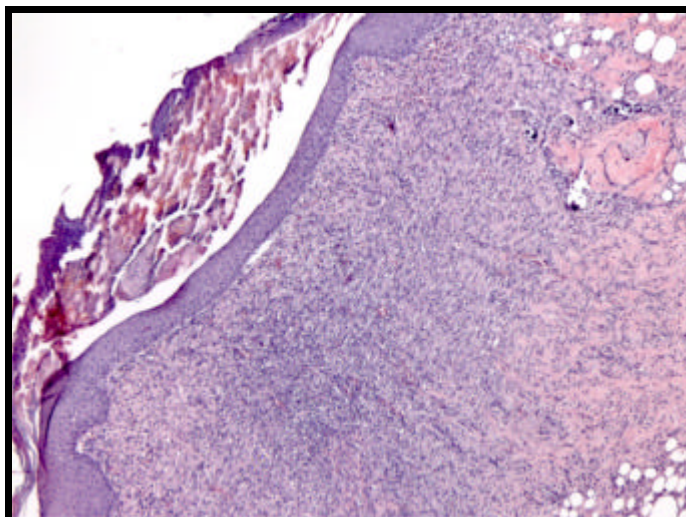


Figura 25 - Fotomicrografia da região mediana da ferida de animal do grupo controle submetido à fototerapia, indicando um processo de reparo com completa epitelização. (HE, 40X).

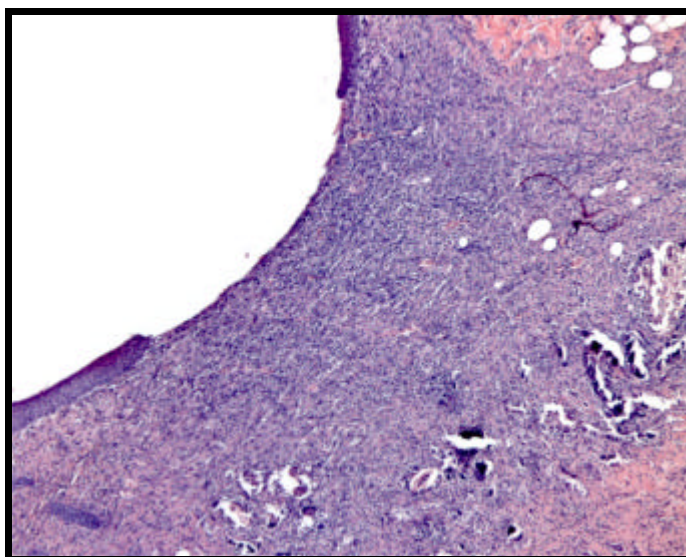


Figura 26 - Fotomicrografia da região mediana da ferida de animal do grupo diabético submetido à fototerapia, indicando um processo de reparo com epitelização incompleta e um infiltrado inflamatório maior se comparado ao grupo controle. (HE, 40X).

5.4 Evolução do reparo das feridas – análise histomorfométrica

Os resultados apresentados são referentes ao término do período experimental (7º dia do estabelecimento das lesões) e obtidos através da quantificação das células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos.

5.4.1 Contagem de células inflamatórias

Observou-se que na porção superficial do grupo placebo controle ocorreu uma predominância da população de células inflamatórias em relação à região profunda desse mesmo grupo ($p < 0,05$). A diferença também foi significativa entre essa região e a região superficial dos grupos LED controle e LASER controle.

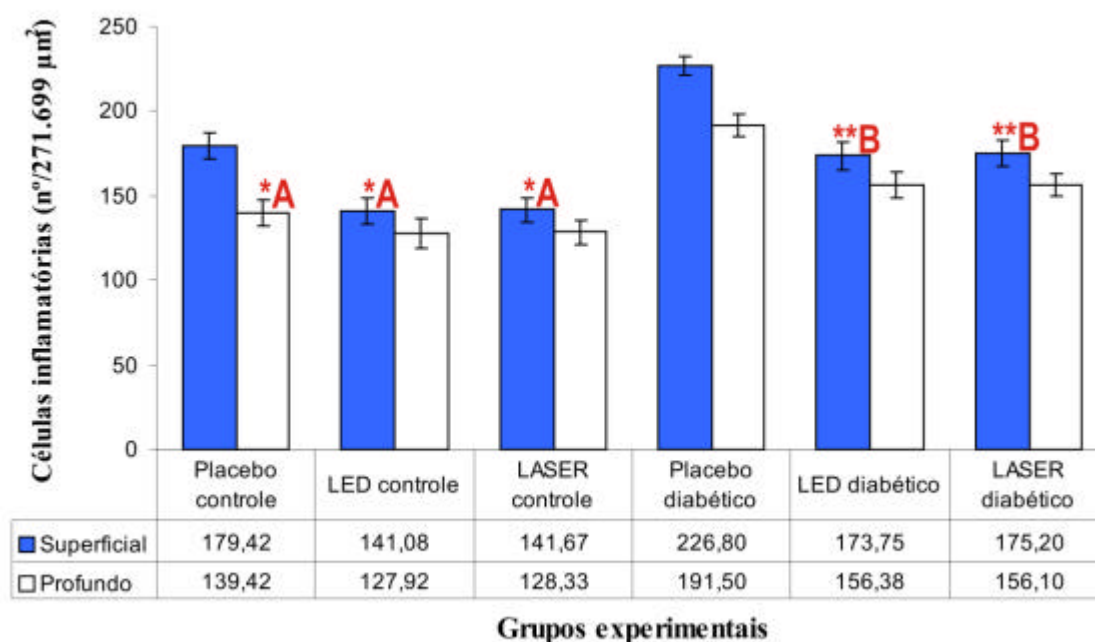


Figura 27 - Gráfico demonstrativo número de células inflamatórias da derme superficial e profunda. ***A** ($p < 0,05$) em relação ao placebo controle superficial. ****B** ($p < 0,01$) em relação ao placebo diabético superficial (ANOVA + Bonferroni). Valores em média $\pm$ erro.

Para os grupos LED diabético e LASER diabético a diferença também foi significativa, porém somente entre o número de células inflamatórias da região superficial, que se apresentou significativamente diminuído em relação ao grupo placebo diabético ($p < 0,01$).

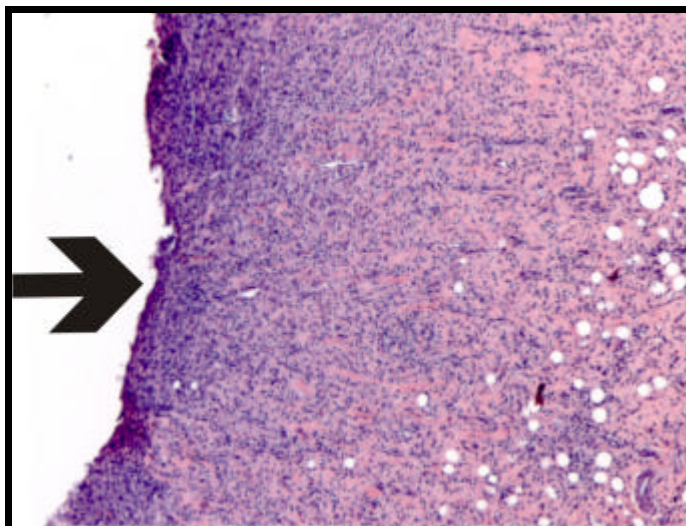


Figura 28 - Fotomicrografia da derme superficial demonstrando o predomínio de células inflamatórias na região da lesão (seta). HE, 40X.

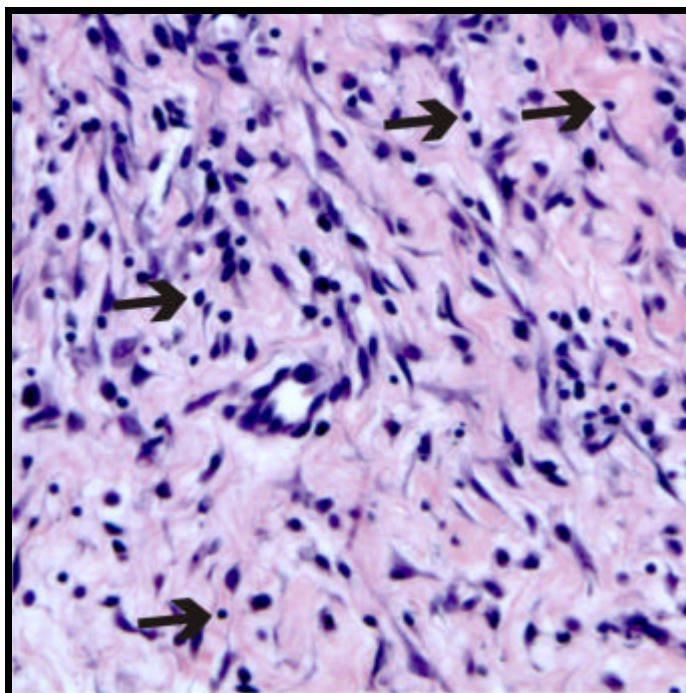


Figura 29 - Fotomicrografia da derme profunda com núcleos basófilos indicativos de células inflamatórias (setas). HE, 200X.

5.4.2 Contagem de vasos sanguíneos

Na figura 31 estão expressas as contagens do número de vasos sanguíneos encontrados em cada região avaliada nos grupos experimentais.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados neste período. Entre os grupos placebo diabético superficial e profundo ($p < 0,01$) em relação ao grupo

placebo controle profundo e entre os grupos LED diabético superficial e LASER diabético superficial ($p < 0,05$) em relação ao grupo placebo diabético superficial.

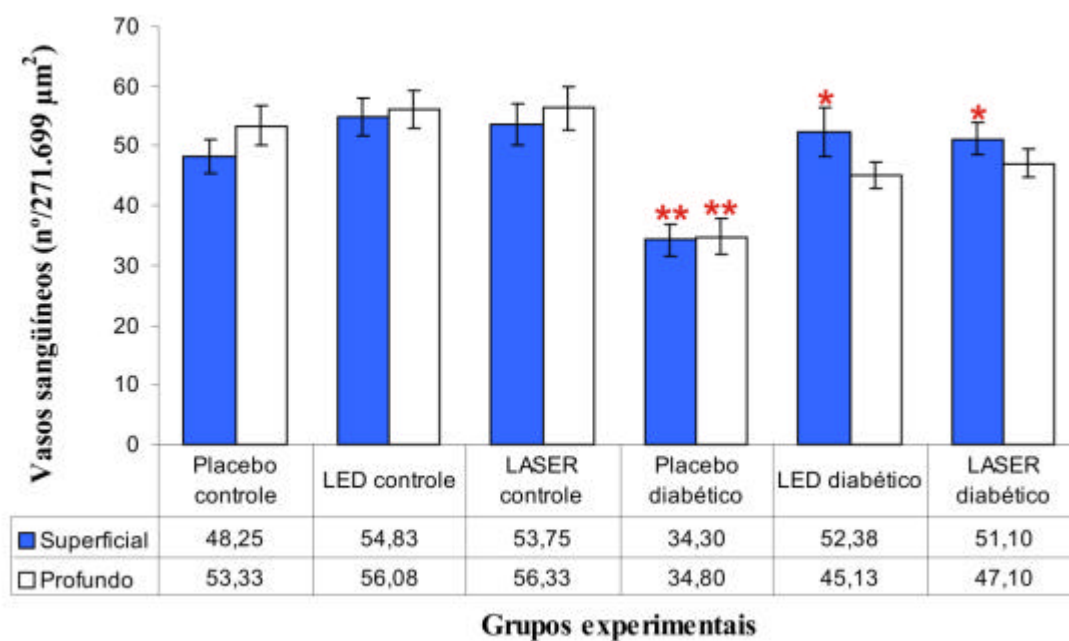


Figura 30 - Gráfico demonstrativo número de vasos sanguíneos da derme superficial e profunda.
 * ($p < 0,05$) em relação ao placebo diabético superficial. ** ($p < 0,01$) em relação ao placebo controle profundo (ANOVA + Bonferroni). Valores em média $\pm$ erro.

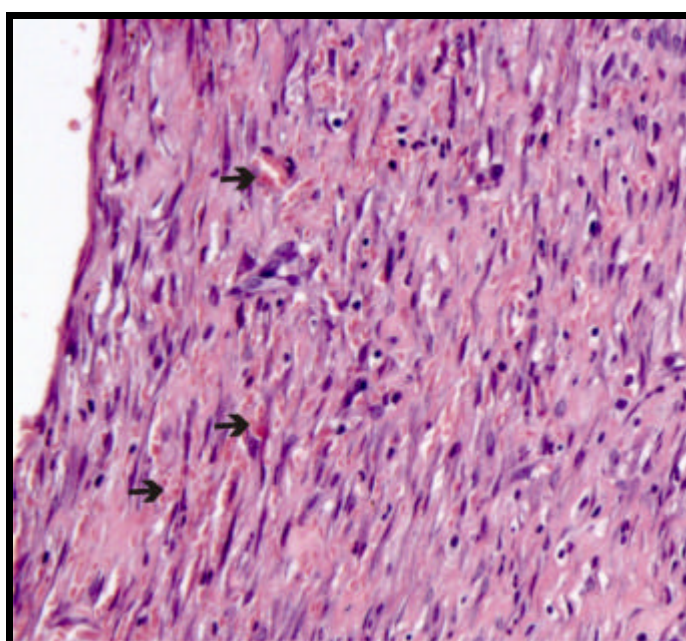


Figura 31 - Fotomicrografia da derme destacando a presença de vasos sanguíneos (setas). HE, 100X.

5.4.3 Contagem de fibroblastos

Pode ser observado um discreto aumento no número de fibroblastos na derme superficial e na profunda nos grupos controles submetidos à irradiação com LED e LASER se comparados ao grupo placebo controle, porém sem diferenças significativas.

Já para o grupo diabético houve o predomínio de fibroblastos na derme profunda em relação à derme superficial e também a presença de um número discretamente superior para os grupos tratados com LED e LASER em relação ao grupo controle. Esses números também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. A figura 33 mostra os valores encontrados.

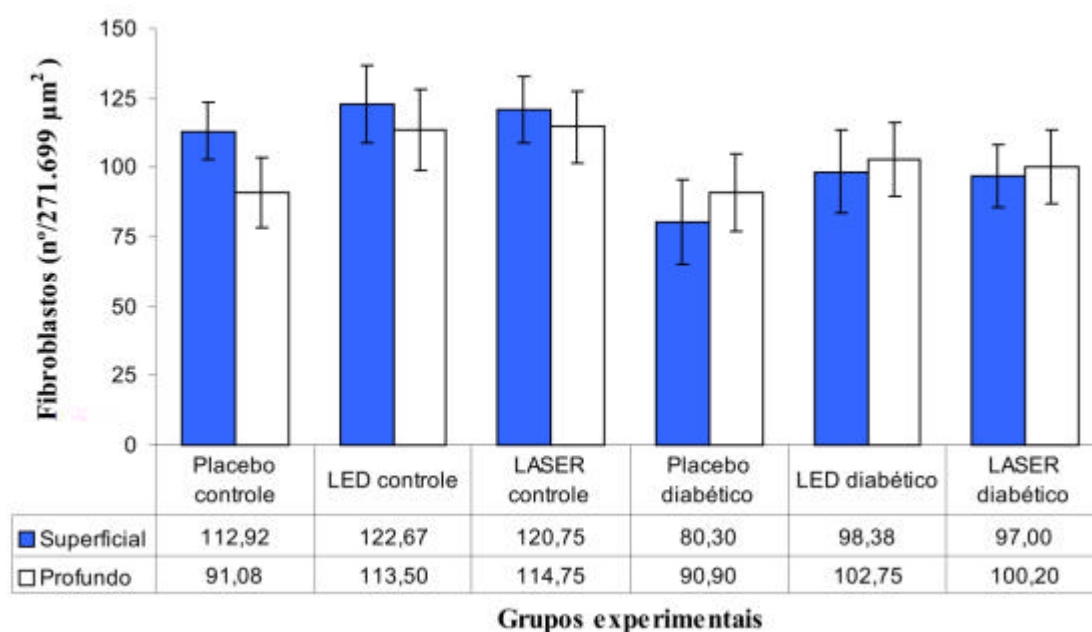


Figura 32 - Gráfico demonstrativo do número de fibroblastos encontrados na derme superficial e profunda. Valores em média $\pm$ erro.

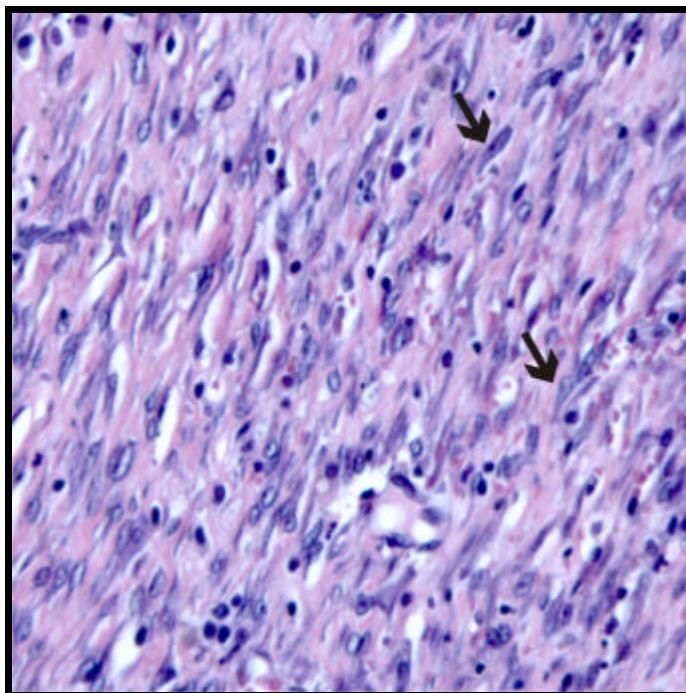


Figura 33 - Fotomicrografia da derme destacando a presença de fibroblastos (setas). HE, 200X.

6 DISCUSSÃO

6.1 Ensaios biológicos

O presente estudo foi idealizado com o objetivo de verificar comparativamente a ação da fototerapia com o uso do LED (luz não coerente) e do laser (luz coerente) em animais diabéticos e não diabéticos, levando-se em conta as evidências existentes de que o diabetes é um fator que retarda o processo de reparo tecidual e que a fototerapia acelera o mesmo.

Como modelo experimental optou-se pelo rato Wistar, considerando seu fácil manuseio e pelas características já conhecidas na indução do diabetes, pois a maioria dos modelos utilizados nos estudos levantados no presente trabalho foram ratos (69%) e nos estudos com esses animais, 89% apresentaram efeitos positivos da fototerapia e somente 13,9% possuíam a presença de fatores agravantes, justificando a realização do presente estudo.

Optou-se pela utilização da aloxana devido ao diabetes experimental induzido por este fármaco reproduzir, em ratos Wistar, sinais clássicos do diabetes humano revelando características como a glicosúria, polifagia, polidipsia e a hiperglicemia (DE LIMA *et al.*, 2001) e também pelos custos reduzidos do fármaco e sua conhecida utilização na indução do diabetes experimental (JORNS *et al.*, 1997).

A análise dos dados obtidos no acompanhamento da evolução clínica dos animais permitiu afirmar que os 18 animais do grupo controle evoluíram sem quaisquer alterações significativas durante o período experimental. Os parâmetros observados, como peso, ingestão alimentar e hídrica mantiveram-se dentro dos níveis esperados para ratos adultos saudáveis.

Em contrapartida, os ratos dos grupos diabéticos evoluíram com parâmetros clínicos e laboratoriais indicativos de diabetes. Os testes laboratoriais revelaram uma significativa elevação da glicemia sanguínea e a pesagem dos mesmos demonstrou uma diminuição gradativa de peso.

Lacerda (1988) explica que o quadro de perda de peso é evidenciado em organismos portadores de diabetes devido à presença de um estado catabólico, com aumento da mobilização lipídica e degradação protéica, associados às perdas hidroeletrólíticas. Al-Watban *et al.* (2006) observaram uma redução de peso no grupo de ratos diabéticos de 27%, enquanto o grupo não diabético apresentou um aumento de 18% no peso durante as 4 semanas de estudo. Dados semelhantes também foram constatados por outros autores que realizaram pesquisas experimentais em animais portadores de diabetes induzido (OBERLEY, 1988; KLIBER *et al.*, 1996; MAIYA *et al.*, 2005).

A glicemia sanguínea elevou-se significativamente no grupo submetido à indução do diabetes. Alguns estudos consideram a hiperglicemia em níveis superiores a 180 mg/dl como indicativo do diabetes e esse parâmetro foi utilizado no presente trabalho para formação do grupo diabético experimental (MAZZANTI *et al.*, 2003). Esse critério permitiu constatar que, no presente estudo, 50% dos animais submetidos à indução manifestaram a hiperglicemia característica da doença corroborando com o encontrado em outros trabalhos. Lerco *et al.* (2003) obtiveram 39% de animais diabéticos, 21,9% de não diabéticos e um índice de mortalidade de 39% durante a primeira semana pós indução.

6.2 Evolução do reparo das feridas

A eficácia da fototerapia na aceleração do processo de reparo de feridas cutâneas é amplamente conhecida. Apesar de vários trabalhos não encontrarem resultados satisfatórios, na maioria das vezes por utilizarem parâmetros experimentais de forma inadequada ou empregando densidades de energia baixas e incapazes de produzir qualquer efeito biológico, o número de pesquisas que comprovaram a sua eficácia vem tornando-se expressivo ao longo do tempo (ALLENDORF, *et al.*, 1997; PETERSEN *et al.*, 1999; SCHLAGER *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2000a; WHELAN *et al.*, 2001; VINCK, 2003; RABELO *et al.*, 2006; CORAZZA, 2007).

O processo de reparo de feridas é habitualmente avaliado clinicamente pela aproximação dos tecidos das suas margens e a maioria dos trabalhos utiliza o diâmetro das mesmas como parâmetro desta verificação.

Nessa perspectiva, no presente estudo foram evidentes os benefícios da fototerapia, pois o diâmetro das feridas apresentou redução significativa no período de 168 horas pós-cirurgia para todos os grupos submetidos à irradiação com laser ou com LED. Essa redução foi mais evidente no grupo de ratos diabéticos em relação ao grupo de não diabéticos, corroborando com os dados encontrados por outros autores em trabalhos semelhantes (REDDY *et al.*, 2001; REDDY, 2003; PESSOA *et al.*, 2004a; MAIYA *et al.*, 2005; RABELO *et al.*, 2006). Al-Watban *et al.* (2006) concluíram que a terapia com o uso de LED é dose dependente e os efeitos encontrados em animais não diabéticos foram menores aos encontrados para animais diabéticos.

Os resultados encontrados no presente estudo permitem afirmar que a luz coerente e não coerente apresentaram efeitos similares no período de 168 horas pós-cirurgia quanto ao diâmetro das feridas. O grupo diabético, submetido à fototerapia com LED, apresentou uma

redução significativa no diâmetro das feridas nas 72 horas pós-cirurgia, quando comparado ao grupo placebo e diabético LASER.

No processo normal de reparo, o período de 72 horas corresponde ao final da atividade dos granulócitos e das células epiteliais (CONTRAN *et al.*, 2000). O melhor efeito encontrado para o LED nessa fase do processo de reparo indica o envolvimento de eventos fotoquímicos independentes da coerência da luz empregada, pois na biomodulação, mesmo com a utilização de uma fonte de luz coerente, essa coerência é perdida ao longo dos primeiros estratos da pele, antes que produza a absorção da luz pelas moléculas (RUBINOV, 2007). Trabalhos comparativos da ação da luz coerente e não coerente concluíram que alguns efeitos são independentes da coerência da luz, como o realizado por Demidova-Rice *et al.* (2007), que não encontraram diferenças entre a terapia com luz não coerente de 635 ± 15 nm e luz coerente (laser de HeNe de 632,8 nm) no reparo de feridas cutâneas dorsais de ratos.

Young *et al.* (1989), submetendo culturas celulares à irradiação com diferentes comprimentos de onda, com luz coerente e não coerente concluíram que a luz, em certos comprimentos de onda pode ser um agente terapêutico útil, estimulando ou inibindo a proliferação celular onde necessário. Também concluíram que a coerência não era determinante em alguns comprimentos de onda para os resultados observados no estudo.

Leme (1981) já afirmava em seu estudo que a insulina é um hormônio pró-inflamatório e na sua ausência todas as fases do processo de reparo podem estar comprometidas. Há muito tempo, também se sabe que, na presença de diabetes, há um aumento do número de células inflamatórias no local da lesão com macrófagos congestionados em relação ao material fagocitado (GOLUB *et al.*, 1978).

No presente estudo, as células inflamatórias apresentaram-se significativamente diminuídas nos grupos tratados em comparação aos grupos controle, tanto para animais diabéticos quanto não diabéticos. Klebanov *et al.* (2005) estudaram o efeito da luz coerente e não coerente sobre a atividade funcional do exsudato leucocitário em feridas cutâneas de ratos e demonstraram que ambas estimularam no ferimento a transição da fase inflamatória para a proliferativa sem diferenças significativas entre elas, concluindo que a coerência não é exigida para essa atividade. Em outros estudos, esses mesmos autores também não observaram diferenças significativas da luz coerente e da não coerente na atividade da enzima superóxido desmutase ou na formação de óxido de nitrogênio pelos fagócitos do fluido das feridas e na diminuição do estresse oxidativo desse mesmo fluido (KLEBANOV *et al.*, 2006a; 2006b). Alguns mecanismos antiinflamatórios da fototerapia com a utilização do LED também já são conhecidos. Lim *et al.* (2007) investigaram o efeito antiinflamatório da irradiação com LED

635nm comparada ao uso de inibidores da ciclooxigenase numa cultura de fibroblastos gengivais humanos e concluíram que a irradiação inibe a síntese de PGE2 e da COX. Deland *et al.* (2007) com o uso da fototerapia com LED constataram um aumento do colágeno e uma diminuição da inflamação com redução do aparecimento de dermatite induzida em pacientes submetidos à radioterapia no tratamento do câncer de mama. Weiss *et al.* (2005) descreveram a experiência de dois anos de utilização do LED 590nm em cirurgia dermatológica, relatando que o componente antiinflamatório do LED associado a componentes de regulação celular ajudam a melhorar o resultado de outros tratamentos de rejuvenescimento.

O número de vasos, no presente estudo, se apresentou aumentado nos grupos submetidos à irradiação de LED e laser, sem diferenças significativas entre as duas terapias. Contudo, esse aumento foi mais evidente nos grupos de animais diabéticos.

Para alguns autores, a angiogênese é uma das características histológicas mais importantes do tecido de granulação no processo de cicatrização de pele (BIONDO-SIMÕES MDE *et al.*, 2005), tanto que a mesma foi evidente em vários estudos realizados com o emprego da TLBP, desde os trabalhos de Barkovskii (1983) e Del'tsova *et al.* (1983), que revelaram a influência do laser no aumento da microvascularização das estruturas nervosas e dos tecidos do intestino delgado de 15 gatos adultos. Atualmente existem evidências que a coerência também não é exigida para o seu estabelecimento. Corazza *et al.* (2007) compararam os efeitos do laser e do LED na angiogênese de feridas cutâneas em ratos e demonstraram que tanto a irradiação com LED vermelho quanto com laser vermelho resultaram em angiogênese, demonstrando que a coerência não era essencial para determinar a proliferação vascular.

No presente trabalho não foi observada diferença significativa no número total de fibroblastos entre os grupos estudados, apesar de ser observado um discreto aumento dessas células na derme superficial e na profunda nos grupos tratados.

A literatura é controversa sobre os resultados encontrados no comportamento dessas células em estudos semelhantes. Schmitt *et al.* (1993) pesquisando sobre a regeneração do tendão em cães, demonstraram que o tratamento com fototerapia não modificou significativamente a produção de fibroblastos e a síntese de fibras colágenas. Porém outros autores, como Carvalho *et al.* (2003), estudando o efeito do laser de baixa potência (HeNe) em feridas cutâneas de ratos, relataram que houve um incremento do processo cicatricial com uma rede de fibras colágenas melhor elaborada nos animais tratados com laserterapia do que em animais não submetidos ao mesmo tratamento, corroborando com dados encontrados em outros trabalhos (HALLMAN *et al.*, 1988; SOARES *et al.*,

1989).

A análise da literatura, somado aos resultados encontrados no presente trabalho demonstraram a existência de várias evidências de que a luz coerente e a não coerente produzem efeitos semelhantes no tecido biológico.

7 CONCLUSÕES

Com base nos parâmetros expostos e nos resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente estudo, pode-se concluir que:

- Os animais dos grupos submetidos à fototerapia apresentaram evolução clínica macroscópica do processo de reparo discretamente mais avançado que os grupos não tratados;
- A análise microscópica revelou quantitativamente e qualitativamente uma melhor evolução no reparo tecidual para os grupos submetidos à fototerapia;
- A fototerapia com uma única aplicação de LED demonstrou-se significativamente mais eficaz na redução do diâmetro das feridas no período de 72 horas pós-lesão que a aplicação, nos mesmos parâmetros, do laser de InGaAlP;
- A fototerapia promoveu um melhor efeito nos animais diabéticos acelerando o processo de reparo, aumentando o número de fibroblastos, diminuindo o número de células inflamatórias e aumentando o número de vasos;
- A luz coerente e não coerente produziram efeitos muito semelhantes no reparo das feridas em todos os períodos de tempo pós-lesão, tanto na análise macroscópica, quanto microscópica.

REFERÊNCIAS

- ABLA, L. E. F.; ISHIZUKA, M. M. A. Fisiopatologia das feridas. In FERREIRA, L. M. (Ed.). **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, 1995.
- ABRAMOVITS, W.; ARRAZOLA, P.; GUPTA, A. K. Light-emitting diode-based therapy. **Skinmed**, v.4, n.1, p.38-41, Jan-Feb 2005.
- AL-WATBAN, F. A.; ANDRES, B. L. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.10-16, Feb 2006.
- AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. The comparison of effects between pulsed and CW laseres on wound healing. **J. Clin Laser Med Surg**, v.22, n.1, p.15-18, 2004.
- ALLENDORF, J. D. F., BESSLER, M., HUANG, J., KAYTON, M. L., LAIRD, D., NOWYGRÓD, R.; TREAT, M. R. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Lasers Surg Med**, v.20, n.3, p.340-345, 1997.
- AMIR, A., SOLOMON, A. S., GILER, S., CORDOBA, M.; HAUBEN, D. J. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. **Br j Plast Surg**, v.53, n.1, p.58-62, Jan 2000.
- ANDERS, J. J., BORKE, R. C., WOOLERY, S. K. e VAN DE MERWE, W. P. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers Surg Med**, v.13, n.1, p.72-82, 1993.
- ANDRADE, M. N. B.; SEWARD, R.; MELO, J. R. D. C. Curativos / Wound dressing. **Rev med Minas Gerais**, v.2, n.4, p.36, out-dez 1992.
- ARISON, R. N.; FEUDALE, E. L. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. **Nature**, v.214, n.5094, p.1254-1255, Jun 17 1967.
- ASAYAMA, K.; ENGLISH, D.; SLONIM, A. E.; BURR, I. M. Chemiluminescence as an index of drug-induced free radical production in pancreatic islets. **Diabetes**, v.33, n.2, p.160-163, Feb 1984.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Cienc Farm**, v.41, n.1 p.27-51, 2005.
- BARKOVSKII, V. S. [Effect of laser radiation on the process of tissue vascularization after damage]. **Arkh Patol**, v.45, n.8, p.72-76, 1983.
- BAXTER, G. D. **Therapeutic laseres: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone. 1994. 259 p.
- _____. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN S. (Ed.). **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998.

BIONDO-SIMÕES MDE, L.; IOSHII, S. O.; BORSATO, K. S.; ZIMMERMANN, E. [The healing process influenced by hypothyroidism and by elderly. Study of abdominal wall healing in rats]. **Acta Cir Bras**, v.20 Suppl 1, p.211-219, 2005.

BISHT, D.; GUPTA, S. C.; MISRA, V.; MITAL, V. P.; SHARMA, P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J Med Res**, v.100, p.43-46, Jul 1994.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: SILVA, J.C.C.B. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>>. Acesso em: 02 jul. 2007.

BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica: agressão, defesa, adaptação, doença**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978. 713 p.

BOGLIOLO FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 367 p.

BORG, L. A.; EIDE, S. J.; ANDERSSON, A.; HELLERSTROM, C. Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells. **Biochem J**, v.182, n.3, p.797-802, Sep 15 1979.

BORGES, E. L.; SAAR, S. R. C.; LIMA, V. L. A. N.; GOMES, F. S. L.; MAGALHÃES, M. B. B. **Feridas: como tratar**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001.

BOWERSOX, J. C. In vivo collagen metabolism in spontaneously diabetic (db/db) mice. **Exp Mol Pathol**, v.45, n.2, p.221-226, Oct 1986.

BUSO, N. C. **Avaliação da ação do laser arseneto de gálio - 904nm no processo de reparação do tendão de Aquiles em ratos**. (Dissertação). Mestrado em Bioengenharia - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

CAMPBELL, M. J. A light and electron microscope study of blood vessels from the gingival tissues of non-diabetic and diabetic patients. **Aust Dent J**, v.16, n.4, p.235-239, Aug 1971.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER N.; SIQUEIRA, J. F. R., FERREIRA, J. V. L.; SILVA, I. S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação de laser HeNe. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 4, p. 253-258, jul./ago. 2003.

CHEN, C. H.; HUNG, H. S.; HSU, S. H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. **Laseres Surg Med**, v.40, n.1, p.46-54, Jan 2008.

CLARK, R. A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. **J Am Acad Dermatol**, v.13, n.5 Pt 1, p.701-725, Nov 1985.

_____. Biology of dermal wound repair. **Dermatol Clin**, v.11, n.4, p.647-666, Oct 1993.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

COOLS, J. **La terapia laser hoy**. Barcelona: Centro de Documentación Láser de meditec 1984.

CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C. ; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.2, p.102-106, Apr. 2007.

CORMARCK, D. H. **Ham histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991. 570 p.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000

DANNO, K.; MORI, N.; TODA, K.; KOBAYASHI, T.; UTANI, A. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. **Photodermatol photoimmunol photomed**, v.17, n.6, p.261-265, Dec 2001.

DE LIMA, M. A., DE LIMA, L. M. B., RITA, D. P. C., NAVARRO, F. C., TATSUKAWA, R. S., PEREIRA, G. D. A., DOS REIS, L. C., DE ABREU, M. E. A. e BORGES, M. D. F. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.34, p.308-314. jul./dez 2001.

DEL'TSOVA, E. I., NEIMAN, A. M. e SHIIAN, O. A. [Effect of helium-neon laser rays on the vascular and nerve tissue structures of the small intestine in the cat]. **Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki**, n.12, p.47-50. 1983.

DELAND, M. M., WEISS, R. A., MCDANIEL, D. H. e GERONEMUS, R. G. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. **Lasers Surg Med**, v.39, n.2, p.164-168. Feb 2007.

DEMIDOVA-RICE, T. N., SALOMATINA, E. V., YAROSLAVSKY, A. N., HERMAN, I. M. e HAMBLIN, M. R. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. **Lasers Surg Med**, v.39, n.9, p.706-715. Oct 2007.

DEMIR, H., BALAY, H. e KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v.41, n.2, p.147-153. Mar-Apr 2004.

DEMIR, H., YARAY, S., KIRNAP, M. e YARAY, K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. **J Rehabil Res Dev**, v.41, n.5, p.721-727. Sep-Oct 2004.

DO NASCIMENTO, P. M., PINHEIRO, A. L. B., SALGADO, M. A. C. e RAMALHO, L. M. P. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: Histological study in rats. **Photomed Laser Surg**, v.22, n.6, p.513-518. Dec 2004.

ECKERSLEY, J. R. e DUDLEY, H. A. Wounds and wound healing. **Br Med Bull**, v.44, n.2, p.423-436. Apr 1988.

FALCÃO, S. C., COELHO, A. R. D. B., ALMEIDA, E. L. D. e GALDINO, C. A. P. D. M. Modified process of image reproduction and amplification for measurement of area by planimetry: Application in plain wounds produced in dogs treated by occlusive skin frog dressings. **J Vet Res and An Sci**, São Paulo. v.38, p.165-169, 2001.

FARIA, E. T. B. D. **Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da Espectroscopia Raman e Análise Histopatológica**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Universidade do Vale do Paraíba - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, SP, 2006.

FARIA, J. L. D. **Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas edição atualizada e ampliada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 298 p.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1074 p.

GABBIANI, G., RYAN, G. B. e MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v.27, n.5, p.549-550. May 15 1971.

GAL, P.; KILIK, R.; SPAKOVA, T.; PATAKY, S.; SABO, J.; POMFY, M.; LONGAUER, F.; HUDAK, R. He-Ne laser irradiation accelerates inflammatory phase and epithelization of skin wound healing in rats. **Biologia**, v.60, n.6, p.691-696, Nov. 2005.

GAL, P., VIDINSKY, B., TOPORCER, T., MOKRY, M., MOZES, S., LONGAUER, F. e SABO, J. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.4, p.480-488, Aug. 2006.

GARDNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456 p.

GARSSEN, J.; VAN DER MOLEN, R.; DE KLERK, A.; NORVAL, M.; VAN LOVEREN, H. Effects of UV irradiation on skin and nonskin-associated herpes simplex virus infections in rats. **Photochem Photobiol**, v.72, n.5, p.645-651, Nov 2000.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise. 2000

GHAMSARI, S. M.; TAGUCHI, K.; ABE, N.; ACORDA, J. A.; SATO, M.; YAMADA, H. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle. **Vet Surg**, v.26, n.2, p.114-120, Mar-Apr 1997.

GLUSHKOVA, O. V.; NOVOSELOVA, E. G.; CHERENKOV, D. A.; NOVOSELOVA, T. V.; KHRENOV, M. O.; LUNIN, S. M.; CHUDNOVSKY, V. M.; YUSUPOV, V. I.; FESENKO, E. E. Effects of exposure of different skin areas to low-power laser light. **Biofizika**, v.51, n.1, p.123-135, Jan-Feb. 2006.

GOLUB, L. M., SCHNEIR, M. e RAMAMURTHY, N. S. Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva: in vitro and in vivo evidence. **J Dent Res**, v.57, n.3, p.520-525, Mar 1978.

GOODSON, W. H.; HUNT, T. K. Wound healing and the diabetic patient. **Surg Gynecol Obstet**, v.149, n.4, p.600-608, Oct 1979.

GORUS, F. K.; MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. **Biochem J**, v.208, n.2, p.513-515. Nov 15, 1982.

GRANDINI, S. A. The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction. Histologic study in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.45, n.2, p.190-199, Feb 1978.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; SEHLIN, J.; TALJEDAL, I. B. Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. **Biochem J**, v.182, n.1, p.17-25. Jul 15, 1979.

GRECO, M.; GUIDA, G.; PERLINO, E.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163, n.3, p.1428-1434, Sep 29 1989.

GUIDUGLI NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Rev Odontol Univ Sao Paulo**, v.1, n.4, p.6-8, Oct-Dec 1987.

GUYTON, A. C. ; HALL, J. E. F. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 572 p.

HALLMAN, H.O.; BASFORD, J.R.; O' BRIEN, JOHN F.; CUMMIS, LAURA A. Does Low-Energy Helium-Neon Laser Irradiation Alter " In Vitro" Replication of Human Fibroblasts? **Lasers Surg. Med.** v.8, p.125-129, 1998.

HARDMANN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMANN, A.; GOODMAN, L. S. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.

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

_____. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.6, p.705-714, Dec 2006.

_____. How long after laser irradiation should cellular responses be measured to determine the laser effect? **J of Laser Appl**, v.19, n.2, p.74-83, May 2007.

HERSON, P. S. e ASHFORD, M. L. Activation of a novel non-selective cation channel by alloxan and H₂O₂ in the rat insulin-secreting cell line CRI-G1. **J Physiol**, v.501 (Pt 1), p.59-66. May 15 1997.

HIB, J. **Di Fiore histologia: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 513 p.

HINDS, J. W.; MCNELLY, N. A. Capillaries in aging rat olfactory bulb: a quantitative light and electron microscopic analysis. **Neurobiol Aging**, v.3, n.3, p.197-207, Fall 1982.

HONMURA, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers Surg Med**, v.12, n.4, p.441-449, 1992.

HOPKINS, J. T.; MCLODA, T. A.; SEEGMILLER, J. G.; BAXTER, G. D. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: A triple-blind, sham-controlled study. **J. Athl Train**, v.39, n.3, p.223-229, Jul-Sep. 2004.

HUANG, P. J.; HUANG, Y. C.; SU, M. F.; YANG, T. Y.; HUANG, J. R.; JIANG, C. P. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.3, p.183-190, Jun 2007.

HUYBRECHTS-GODIN, G., HAUSER, P. e VAES, G. Macrophage-fibroblast interactions in collagenase production and cartilage degradation. **Biochem J**, v.184, n.3, p.643-650. Dec 15 1979.

IWASE, M.; NUNOI, K.; WAKISAKA, M.; KIKUCHI, M.; MAKI, Y.; SADOSHIMA, S.; FUJISHIMA, M. Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism**, v.40, n.1, p.10-14, Jan 1991.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res**, v.53, n.2, p.131-42. 2004.

JORNS, A.; MUNDAY, R.; TIEDGE, M.; LENZEN, S. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. **J Endocrinol**, v.155, n.2, p.283-293, Nov. 1997.

JORNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. **Free Radic Biol Med**, v.26, n.9-10, p.1300-1304, May 1999.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**, v.48, n.11, p.2129-2139, Nov 1969.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALEND, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**, v.27, n.3, p.219-223, Mar 1995.

KAZUMI, T., YOSHINO, G., FUJII, S. e BABA, S. Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. **Cancer Res**, v.38, n.7, p.2144-2147. Jul 1978.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v.21, n.9, p.1414-1431. Sep 1998.

KLEBANOV, G. I.; SHURAEVA, N. Y.; CHICHUK, T. V.; OSIPOV, A. N.; RUDENKO, T. G.; SHEKHTER, A. B.; VLADIMIROV, Y. A. A comparative study of the effects of laser and light-emitting diode irradiation on the wound healing and functional activity of wound exudate leukocytes. **Biofizika**, v.50, n.6, p.1137-1144, Nov-Dec 2005.

KLEBANOV, G. I.; SHURAEVA, N. Y.; CHICHUK, T. V.; OSIPOV, A. N.; VLADIMIROV, Y. A. Comparison of the effects of laser and light-emitting diodes on lipid peroxidation in rat wound exudate. **Biofizika**, v.51, n.2, p.332-339, Mar-Apr 2006a.

_____. A comparison of the effects of laser and light-emitting diodes on superoxide dismutase activity and nitric oxide production in rat wound fluid. **Biofizika**, v.51, n.1, p.116-122, Jan-Feb 2006b.

KLIBER, A.; SZKUDELSKI, T.; CHICHOLOWSKA, J. Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. **J Physiol Pharmacol**, v.47, n.2, p.321-328, Jun 1996.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I. A.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, n.2, p.262-270. Aug 1981.

LACERDA, S. N. **Diabetes mellitus**. São Paulo: Pirâmide. 1988

LAVAGNA, S. M.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; BONSIGNORE, L.; OTTAVIANI, A; BIZZARRI, B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. **Farmaco**, v.56, n.5-7, p.451-453, May-Jul 2001.

LEME, J. G. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. **Gen Pharmacol**, v.12, n.1, p.15-24. 1981.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochem Pharmacol**, v.42, n.7, p.1385-1391, Sep 12 1991.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v.18, n.2, p.132-142, Mar./Apr 2003.

LERNMARK, A. Molecular biology of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.28, n.4, p.195-203, Apr 1985.

LIM, W.; LEE, S.; KIM, I.; CHUNG, M.; KIM, M.; LIM, H.; PARK, J.; KIM, O.; CHOI, H. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. **Lasers Surg Med**, v.39, n.7, p.614-621, Aug 2007.

LIMA, M. A. D.; LIMA, L. M. B. D.; RITA, D. P. C.; NAVARRO, F. C.; TATSUKAWA, R. S.; PEREIRA, G. D. A.; REIS, L. C. D.; ABREU, M. E. A. D.; BORGES, M. D. F. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina** (Ribeirão Preto), v.34, p.308-314, jul./dez 2001.

LOPES, C. D. O.; RIGAU I MAS, J.; ZANGARO, R. A. Prevenção da xerostomia e da mucosite oral induzidas por radioterapia com uso do laser de baixa potência. **Radiol Bras**, v.39, n.2, p.131-136, 2006.

LOPES, R. D.; NEVES, L. B.; D'ALMEIDA, V.; CONCEIÇÃO, G. M. S.; GABRIEL JUNIOR, A. Homocisteína plasmática total e fator von Willebrand no diabetes melito experimental. **Arq Brás Cardiol**, v.88, p.424-429, 2007.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. São Paulo: Manole, 2001. 472 p.

MAIYA, G. A., KUMAR, P. e RAO, L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.2, p.187-190, Apr 2005.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária : Farmacologia e Técnicas** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 326 p.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. S.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais diabéticos. **Ciência Rural**, v.33, p.1061-1065, 2003.

MCGRATH, M. H.; SIMON, R. H. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. **Plast Reconstr Surg**, v.72, n.1, p.66-73, Jul. 1983.

MEDEIROS, I. S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MEDEIROS, M. V.; BINHARA, I. M.; MORENO JUNIOR, H.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **Eur J Pharmacol**, v.285, n.2, p.109-14, Oct 16 1995.

MEDRADO, A. R.; PUJOS, D. L. S. **Uso de laser de baixa potência na cicatrização de feridas**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MENDEZ, T. M. T. V.; PINHEIRO, A. L. B.; PACHECO, M. T. T.; NASCIMENTO, P. M.; RAMALHO, L. M. P. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **J Clin Laser Med Surg**, v.22, n.1, p.19-25, Feb 2004.

MIRZAEI, M.; BAYAT, M.; MOSAFA, N.; MOHSENIFAR, Z.; PIRYAEI, A.; FAROKHI, B.; REZAEI, F.; SADEGHI, Y.; RAKHSHAN, M. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.6, p.519-525, Dec 2007.

MUNDAY, R.; LUDWIG, K.; LENZEN, S. The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. **J Endocrinol**, v.139, n.1, p.153-163. Oct 1993.

NAGY, S.; REDEI, A.; KARADY, S. The effect of insulin on production of granulation tissue in rats. **Experientia**, v.16, p.121-123, Mar 15 1960.

NAKASONE, A.; SHIBATA, S.; SUZUKI, S.; YAMASHITA, Y.; OHYAMA, K. Wound-healing process of fetal mouse by argon laser. **J Dent Res**, v.82, p.B82-B82, Jun 2003.

NICOLAU, R. A. **Efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Universidade do Vale do Paraíba - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, SP, 2001.

NISHIGAKI, A. Experimental studies of skin wound healing process by first intention in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. **Shikwa Gakuho**, v.89, n.4, p.793-822, Apr 1989.

OBERLEY, L. W. Free radicals and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v.5, n.2, p.113-124, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and complications**. Geneva: WHO, 1999. 59p.

ORLOFF, M. J.; LEE, S.; CHARTERS 3RD, A. C.; GRAMBORT, D. E.; STORCK, L. G.; KNOX, D. Long term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. **Ann Surg**, v.182, n.3, p.198-206; Sep 1975.

ORLOFF, M. J.; MACEDO, A.; MACEDO, C.; YAMANAKA, N.; HUANG, Y. T.; HUANG, D. G.; LENG, X. S.; STIEBER, A.; KREIDIEH, I.; GREENLEAF, G. Prevention, stabilization, and reversal of the metabolic disorders and secondary complications of diabetes by pancreas transplantation. **Transplant Proc**, v.20, n.1 Suppl 1, p.868-873, Feb 1988.

PACHECO, M. T. T. **Laseres Noções Básicas**. São José dos Campos: UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba, 2007. (Apostila)

PASSARELLA, S.; OSTUNI, A.; ATLANTE, A.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v.156, n.2, p.978-986, Oct 31 1988.

PESSOA, E. S.; MELHADO, R. M.; THEODORO, L. H.; GARCIA, V. G. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. **Photomed Laser Surg**, v.22, n.3, p.199-204, Jun 2004a.

PETERSEN, S. L., BOTES, C., OLIVIER, A. e GUTHRIE, A. J. The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. **Equine Vet J**, v.31, n.3, p.228-231, May 1999.

PINHEIRO, A. L. B. Evolução Histórica e classificação dos laseres. In: BRUGNERA JUNIOR, Aldo; PINHEIRO, Antonio Luiz B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998a. p.17-26

_____. Interação Tecidual: Laseres cirúrgicos. In: BRUGNERA JUNIOR, Aldo; PINHEIRO, Antonio Luiz B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998b. p.45-62.

PINHEIRO, A. L. B.; POZZA, D. H.; DE OLIVEIRA, M. G.; WEISSMANN, R.; RAMALHO, L. M. P. Polarized light (400-2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): A description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.5, p.485-492, Oct 2005.

PONTINEN, P. J.; AALTOKALLIO, T.; KOLARI, P. J. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. **Acupunct Electrother Res**, v.21, n.2, p.105-118, Apr-Jun 1996.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Brás**, v.17, n.4, p.307-313, Oct-Dec 2003.

RABELO, S. B. **Efeito da fotoestimulação com laser de baixa potência na cicatrização de feridas em ratos portadores de Diabetes induzido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Universidade do Vale do Paraíba - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, SP, 2003.

RABELO, S. B.; VILLAVERDE, A. B.; NICOLAU, R.A; SALGADO, M. A.C.; MELO, M.S.; PACHECO, M.T. T. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.4, p.474-479, Aug 2006.

REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As laseres on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers Surg Med**, v.33, n.5, p.344-351, 2003.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound repair regen**, v.9, n.3, p.248-255, May-Jun 2001.

RENVERT, S. Destructive periodontal disease in relation to diabetes mellitus, cardiovascular diseases, osteoporosis and respiratory diseases. **Oral Health Prev Dent**, v.1 Suppl 1, p.341-357; discussion 358-359, 2003.

RIBEIRO, M. S.; DA SILVA, D. D. T.; DE ARAUJO, C. E. N.; DE OLIVEIRA, S. F.; PELEGRINI, C. M. R.; ZORN, T. M. T.; ZECELL, D. M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: A light microscopy study. **J Clin Laser Méd Surg**, v.22, n.1, p.59-66, Feb 2004.

RIGAU I MAS, J. **Acción de la Luz Láser a Baja Intensidad en la Modulación de la Función Celular**. (Doutorado). Universitat Rovira í Virgili, Espanha, 1996. 208 p.
ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993. 779 p.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 1564 p.

RUBINOV, A. N. **Physical mechanisms of biological effect of coherent and noncoherent light**. LASERWORLD. Swedish Laser Medical Society. The Low Level Laser Therapy. Disponível em: <http://www.laser.nu/lllt/lllt_editorial13.htm>. Acesso em: 2 jul. 2007.

SAHL, W. J.; CLEVER, H. Cutaneous scars: Part I. **Int J Dermatol**, v.33, n.10, p.681-691, Oct 1994.

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. (Ed.). **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.265-306.

SCHIMITT, L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D.L.; CASTAGNA, C. D.; GEHVER, C.; MAIORKA, P. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendão em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim Sci**. São Paulo. v. 30, n. 2, p. 145-149, 1993.

SCHINDL, A.; HEINZE, G.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H.; SCHINDL, L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvasc Res**, v.64, n.2, p.240-246, Sep 2002.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHON, H.; KNOBLER, R.; HAVELEC, L.; SCHINDL, L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, v.21, n.4, p.580-584. Apr 1998.

SCHLAGER, A.; KRONBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER, H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. **Lasers Surg Med**, v.27, n.1, p.39-42, 2000.

SCHNEIR, M.; BOWERSOX, J.; RAMAMURTHY, N.; YAVELow, J.; MURRAY, J.; EDLIN-FOLZ, E.; GOLUB, L. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes. Tissue-specific effects on collagen metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v.583, n.1, p.95-102, Feb 19 1979.

SEPPALA, B.; SORSA, T.; AINAMO, J. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. **J Periodontol**, v.68, n.12, p.1237-1245, Dec 1997.

SOARES, J. H.; TARDIVO, J. P.; GOLDENBERG, S.; KATZ, S.; MOURA, L. A. R. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o laser de hélio-neônio. **Acta cir. Bras.** V.4, p.56-60, 1989.

SILVA, C. R. D. **Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas cutâneas de ratos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Universidade do Vale do Paraíba - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, SP, 2006.

SILVA, E. C. Radiação laser. In: RODRIGUES, (E. M. Ed.). **Manual de recursos terapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p.17-35.

SILVA, R. C. L. D.; DE FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: Fundamentos e Atualizações em Enfermagem** São Caetano do Sul, SP: Yendis, 2007. 544 p.

SILVEIRA, P. C. L.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B**, v.86, n.3, p.279-282, Mar 1 2007.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A. D.; DEPOLO, A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: A randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **J Clin Laser Méd Surg**, v.18, n.2, p.67-73, Apr 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238 p.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of Low-Level Laser Therapy for Chronic Cutaneous Ulceration in Humans: A Review and Discussion. **Dermatol Surg**, Apr 22 2008.

STADLER, I.; BRONDON, P.; LANZAFAME, R. J. Combined static magnetic field and led phototherapy improves wound healing in the rat model. **Lasers Surg Med**, p.58-58, Mar 2005.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, 2002. 655 p.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia humana**. São Paulo: Manole, 1997

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatopatológico da cicatrização cutânea do gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904nm). **Acta Cir Bras**, v.13. 1998.

TAVARES, M. R.; MAZZER, N.; PASTORELLO, M. Efeitos do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioter Bras**, v.6, n.2, p.96-100, 2005.

TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T.; CHOU, M. Y.; ELOVIC, A.; GALLAGHER, G. T.; WONG, D. T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **Am J Pathol**, v.138, n.6, p.1307-1313, Jun 1991.

VEÇOSO, M. C. **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.

VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v.18, n.2, p.95-99, 2003.

WALKER, M. D.; RUMPF, S.; BAXTER, G. D.; HIRST, D. G.; LOWE, A. S. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v.26, n.1, p.41-47, 2000a.

_____. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v.26, n.1, p.41-47, 2000b.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and Surgical Technique in the Rat**. Londres: Academy Press, 2004. 382 p.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **J photochem photobiol B**, v.70, n.1, p.39-44, Apr 2003.

WEISS, R. A.; MCDANIEL, D. H.; GERONEMUS, R. G.; WEISS, M. A.; BEASLEY, K. L.; MUNAVALLI, G. M.; BELLEW, S. G. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. **Dermatol Surg**, v.31, n.9 Pt 2, p.1199-205, Sep 2005.

WHELAN, H. T.; BUCHMANN, E. V.; DHOKALIA, A.; KANE, M. P.; WHELAN, N. T.; WONG-RILEY, M. T. T.; EELLS, J. T.; GOULD, L. J.; HAMMAMIEH, R.; DAS, R.; JETT, M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J Clin Laser Med Surg**, v.21, n.2, p.67-74, Apr 2003.

WHELAN, H. T.; CONNELLY, J. F.; HODGSON, B. D.; BARBEAU, L.; POST, A. C.; BULLARD, G.; BUCHMANN, E. V.; KANE, M.; WHELAN, N. T.; WARWICK, A.; MARGOLIS, D. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, n.6, p.319-324, Dec 2002.

WHELAN, H. T. ; SMITS, R. L. ; BUCHMAN, E. V. ; WHELAN, N. T. ; TURNER, S. G. ; MARGOLIS, D. A. ; CEVENINI, V. ; STINSON, H., IGNATIUS, R., MARTIN, T., CWIKLINSKI, J., PHILIPPI, A. F., GRAF, W. R. ; HODGSON, B. ; GOULD, L. ; KANE, M. ; CHEN, G.; CAVINESS, J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **J Clin Laser Med Surg**, v.19, n.6, p.305-314, Dec 2001.

WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Williams: Tratado de Endocrinologia**. São Paulo: Manole, 1998

WONG-RILEY, M. T.; BAI, X.; BUCHMANN, E.; WHELAN, H. T. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. **Neuroreport**, v.12, n.14, p.3033-3037, Oct 8 2001.

YILMAZ, N.; COMELEKOGLU, U.; AKTAS, S.; COSKUN, B.; BAGIS, S. Effect of low-energy gallium arsenide (GaAs, 904 nm) laser irradiation on wound healing in rat skin. **Wounds**, v.18, n.11, p.323-328, Nov 2006.

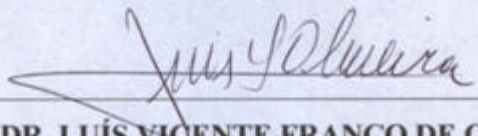
YOUNG, M. **Óptica e Lasers**. São Paulo: EDUSP. 1998. 439 p.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C.
Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med**, v.9, n.5, p.497-505, 1989.

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

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

 FVE Fundação Valeparaibana de Ensino	 UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA UNIVAP 	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo n.ºA058/CEP/2007, sobre <i>“Avaliação dos efeitos da fototerapia no reparo tecidual em feridas cutâneas de ratos imunossuprimidos com a utilização de LED 635 +- 20nm ou laser em baixa potência(Ingap 685nm).”</i> sob a responsabilidade de <i>Renata Amadei Nicolau</i> foi <i>aprovado</i> por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais. Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.	
 São José dos Campos, 26 de julho de 2007.	
 	
PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Universidade do Vale do Paraíba – Univap	
Av. Shishima Hifumi, 2911 – URBANOVA – CEP: 12.244-000 – PABX (12) 3947.1121 – FAX (12) 3947.1149 – Caixa Postal 82 – S.J.Campo-SP	

APÊNDICE

Apêndice A – Análises estatísticas

ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO PESO NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
-----	-----	-----	-----
Treatments (between columns)	5	24702	4940.5
Residuals (within columns)	116	34625	298.49
=====	=====	=====	
Total	121	59327	

F = 16.551

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett statistic (corrected) = 17.831

The P value is 0.0032.

This test suggests that the difference among the SDs is very significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 2.997 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
-----	-----	-----	-----
Controle inici vs Controle 7d	-8.770	1.523	ns P>0.05
Controle inici vs Controle 14d	-22.610	3.926	** P<0.01
Controle inici vs Diabéticoinic	-4.300	0.8622	ns P>0.05
Controle inici vs Diabético7d	17.450	3.030	* P<0.05
Controle inici vs Diabético14d	23.920	3.885	** P<0.01
Controle 7d vs Controle 14d	-13.840	2.403	ns P>0.05
Controle 7d vs Diabéticoinic	4.470	0.8963	ns P>0.05
Controle 7d vs Diabético7d	26.220	4.553	*** P<0.001
Controle 7d vs Diabético14d	32.690	5.310	*** P<0.001
Controle 14d vs Diabéticoinic	18.310	3.671	** P<0.01

Controle 14d vs Diabético7d	40.060	6.956	***	P<0.001
Controle 14d vs Diabético14d	46.530	7.558	***	P<0.001
Diabéticoinic vs Diabético7d	21.750	4.361	***	P<0.001
Diabéticoinic vs Diabético14d	28.220	5.186	***	P<0.001
Diabético7d vs Diabético14d	6.470	1.051	ns	P>0.05

ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA GLICEMIA NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	334498	66900
Residuals (within columns)	116	19589	168.87
=====	=====	=====	
Total	121	354087	

F = 396.16

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett statistic (corrected) = 6.457

The P value is 0.2642.

This test suggests that the difference among the SDs is not significant.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 2.997 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
Controle inici vs Controle 7d	-2.110	0.4871	ns P>0.05
Controle inici vs Controle 14d	-4.150	0.9581	ns P>0.05
Controle inici vs Diabéticoinic	2.520	0.6718	ns P>0.05
Controle inici vs Diabético7d	-121.40	28.026	*** P<0.001
Controle inici vs Diabético14d	-116.22	25.098	*** P<0.001
Controle 7d vs Controle 14d	-2.040	0.4710	ns P>0.05
Controle 7d vs Diabéticoinic	4.630	1.234	ns P>0.05
Controle 7d vs Diabético7d	-119.29	27.539	*** P<0.001
Controle 7d vs Diabético14d	-114.11	24.642	*** P<0.001
Controle 14d vs Diabéticoinic	6.670	1.778	ns P>0.05
Controle 14d vs Diabético7d	-117.25	27.068	*** P<0.001
Controle 14d vs Diabético14d	-112.07	24.201	*** P<0.001
Diabético inic vs Diabético7d	-123.92	33.034	*** P<0.001
Diabético inic vs Diabético14d	-118.74	29.010	*** P<0.001
Diabético7d vs Diabético14d	5.180	1.119	ns P>0.05

ANÁLISES DO DIÂMETRO DAS FERIDAS - GRUPO CONTROLE

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	20	185.57	9.279
Residuals (within columns)	105	19.199	0.1828
=====	=====	=====	
Total	125	204.77	

F = 50.744

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett statistic (corrected) = 22.646

The P value is 0.3065.

This test suggests that the difference among the SDs is not significant.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.806 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
Placebo 24hs vs Placebo168hs	3.124	12.654	*** P<0.001
Placebo 24hs vs Placebo 48hs	0.5440	2.204	ns P>0.05
Placebo 24hs vs LED 24hs	0.2500	1.013	ns P>0.05
Placebo 24hs vs LASER 24hs	0.2150	0.8709	ns P>0.05
Placebo 48hs vs Placebo 72hs	0.4340	1.758	ns P>0.05
Placebo 48hs vs LED 48hs	0.2880	1.167	ns P>0.05
Placebo 48hs vs LASER 48hs	0.2370	0.9600	ns P>0.05
Placebo 72hs vs Placebo 96hs	0.4650	1.884	ns P>0.05
Placebo 72hs vs LED 72hs	0.7700	3.119	ns P>0.05
Placebo 72hs vs LASER 72hs	0.6310	2.556	ns P>0.05
Placebo 96hs vs Placebo 120hs	0.6160	2.495	ns P>0.05
Placebo 96hs vs LED 96hs	0.7350	2.977	ns P>0.05
Placebo 96hs vs LASER 96hs	0.6550	2.653	ns P>0.05
Placebo 120hs vs Placebo 144hs	0.2810	1.138	ns P>0.05
Placebo 120hs vs LED 120hs	0.7830	3.172	ns P>0.05
Placebo 120hs vs LASER 120hs	0.6460	2.617	ns P>0.05
Placebo 144hs vs Placebo168hs	0.7840	3.176	ns P>0.05
Placebo 144hs vs LED 144hs	0.7880	3.192	ns P>0.05
Placebo 144hs vs LASER 144hs	0.7210	2.920	ns P>0.05
Placebo168hs vs LED 168hs	1.012	4.099	* P<0.05
Placebo168hs vs LASER 168hs	1.043	4.225	* P<0.05

LED 24hs vs LED 168hs	3.886	15.740	***	P<0.001
LED 24hs vs LED 48hs	0.5820	2.357	ns	P>0.05
LED 24hs vs LASER 24hs	-0.03500	0.1418	ns	P>0.05
LED 48hs vs LED 72hs	0.9160	3.710	ns	P>0.05
LED 48hs vs LASER 48hs	-0.05100	0.2066	ns	P>0.05
LED 72hs vs LED 96hs	0.4300	1.742	ns	P>0.05
LED 72hs vs LASER 72hs	-0.1390	0.5630	ns	P>0.05
LED 96hs vs LED 120hs	0.6640	2.690	ns	P>0.05
LED 96hs vs LASER 96hs	-0.08000	0.3240	ns	P>0.05
LED 120hs vs LED 144hs	0.2860	1.158	ns	P>0.05
LED 120hs vs LASER 120hs	-0.1370	0.5549	ns	P>0.05
LED 144hs vs LED 168hs	1.008	4.083	*	P<0.05
LED 144hs vs LASER 144hs	-0.06700	0.2714	ns	P>0.05
LED 168hs vs LASER 168hs	0.03100	0.1256	ns	P>0.05
LASER 24hs vs LASER 168hs	3.952	16.008	***	P<0.001
LASER 24hs vs LASER 48hs	0.5660	2.293	ns	P>0.05
LASER 48hs vs LASER 72hs	0.8280	3.354	ns	P>0.05
LASER 72hs vs LASER 96hs	0.4890	1.981	ns	P>0.05
LASER 96hs vs LASER 120hs	0.6070	2.459	ns	P>0.05
LASER 120hs vs LASER 144hs	0.3560	1.442	ns	P>0.05
LASER 144hs vs LASER 168hs	1.106	4.480	**	P<0.01

ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS FERIDAS - GRUPO DIABÉTICO

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	20	118.78	5.939
Residuals (within columns)	77	15.400	0.2000
=====	=====	=====	
Total	97	134.18	

F = 29.693

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because a sample size is too small.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.855 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
Placebo 24hs vs Placebo 48hs	0.4700	1.662	ns P>0.05
Placebo 24hs vs Placebo168hs	2.496	8.825	*** P<0.001
Placebo 24hs vs LED 24hs	0.4380	1.460	ns P>0.05
Placebo 24hs vs LASER 24hs	0.3830	1.354	ns P>0.05
Placebo 48hs vs Placebo 72hs	0.2290	0.8096	ns P>0.05
Placebo 48hs vs LED 48hs	0.4330	1.443	ns P>0.05
Placebo 48hs vs LASER 48hs	0.1120	0.3960	ns P>0.05
Placebo 72hs vs Placebo 96hs	0.3660	1.294	ns P>0.05
Placebo 72hs vs LED 72hs	1.187	3.957	* P<0.05
Placebo 72hs vs LASER 72hs	0.7500	2.652	ns P>0.05
Placebo 96hs vs Placebo 120hs	0.5300	1.874	ns P>0.05
Placebo 96hs vs LED 96hs	1.063	3.543	ns P>0.05
Placebo 96hs vs LASER 96hs	0.9170	3.242	ns P>0.05
Placebo 120hs vs Placebo 144hs	0.3810	1.347	ns P>0.05
Placebo 120hs vs LED 120hs	0.8910	2.970	ns P>0.05
Placebo 120hs vs LASER 120hs	0.8090	2.860	ns P>0.05
Placebo 144hs vs Placebo168hs	0.5200	1.838	ns P>0.05
Placebo 144hs vs LED 144hs	1.079	3.597	ns P>0.05
Placebo 144hs vs LASER 144hs	1.050	3.712	ns P>0.05
Placebo168hs vs LED 168hs	1.368	4.560	** P<0.01
Placebo168hs vs LASER 168hs	1.250	4.419	** P<0.01

LED 24hs vs LED 48hs	0.4650	1.470	ns	P>0.05
LED 24hs vs LED 168hs	3.426	10.834	***	P<0.001
LED 24hs vs LASER 24hs	-0.05500	0.1833	ns	P>0.05
LED 48hs vs LED 72hs	0.9830	3.108	ns	P>0.05
LED 48hs vs LASER 48hs	-0.3210	1.070	ns	P>0.05
LED 72hs vs LED 96hs	0.2420	0.7653	ns	P>0.05
LED 72hs vs LASER 72hs	-0.4370	1.457	ns	P>0.05
LED 96hs vs LED 120hs	0.3580	1.132	ns	P>0.05
LED 96hs vs LASER 96hs	-0.1460	0.4867	ns	P>0.05
LED 120hs vs LED 144hs	0.5690	1.799	ns	P>0.05
LED 120hs vs LASER 120hs	-0.08200	0.2733	ns	P>0.05
LED 144hs vs LED 168hs	0.8090	2.558	ns	P>0.05
LED 144hs vs LASER 144hs	-0.02900	0.09667	ns	P>0.05
LED 168hs vs LASER 168hs	-0.1180	0.3933	ns	P>0.05
LASER 24hs vs LASER 48hs	0.1990	0.7036	ns	P>0.05
LASER 24hs vs LASER 168hs	3.363	11.890	***	P<0.001
LASER 48hs vs LASER 72hs	0.8670	3.065	ns	P>0.05
LASER 72hs vs LASER 96hs	0.5330	1.884	ns	P>0.05
LASER 96hs vs LASER 120hs	0.4220	1.492	ns	P>0.05
LASER 120hs vs LASER 144hs	0.6220	2.199	ns	P>0.05
LASER 144hs vs LASER 168hs	0.7200	2.546	ns	P>0.05

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	11	50463	4587.6
Residuals (within columns)	52	15782	303.51
=====	=====	=====	
Total	63	66246	

F = 15.115

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because a sample size is too small.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.579 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
PCEBO CONT SUP vs PCEBO CONT PRO	40.000	3.977	* P<0.05
PCEBO CONT SUP vs LED CONT SUP	38.340	3.812	* P<0.05
PCEBO CONT SUP vs LED CONT PRO	51.500	5.120	*** P<0.001
PCEBO CONT SUP vs LASER CONT SUP	37.750	3.753	* P<0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER CONT PRO	51.090	5.079	*** P<0.001
PCEBO CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	-47.380	4.491	** P<0.01
PCEBO CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	-12.080	1.145	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED DIAB SUP	5.670	0.5042	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED DIAB PRO	23.040	2.049	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER DIAB SUP	4.220	0.4000	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER DIAB PRO	23.320	2.211	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED CONT SUP	-1.660	0.1650	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED CONT PRO	11.500	1.143	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER CONT SUP	-2.250	0.2237	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER CONT PRO	11.090	1.103	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	-87.380	8.283	*** P<0.001
PCEBO CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	-52.080	4.937	*** P<0.001
PCEBO CONT PRO vs LED DIAB SUP	-34.330	3.053	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED DIAB PRO	-16.960	1.508	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER DIAB SUP	-35.780	3.392	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER DIAB PRO	-16.680	1.581	ns P>0.05

LED CONT SUP vs LED CONT PRO	13.160	1.308	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER CONT SUP	-0.5900	0.05866	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER CONT PRO	12.750	1.268	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	-85.720	8.126	***	P<0.001
LED CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	-50.420	4.779	***	P<0.001
LED CONT SUP vs LED DIAB SUP	-32.670	2.905	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LED DIAB PRO	-15.300	1.361	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER DIAB SUP	-34.120	3.234	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER DIAB PRO	-15.020	1.424	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER CONT SUP	-13.750	1.367	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER CONT PRO	-0.4100	0.04076	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	-98.880	9.373	***	P<0.001
LED CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	-63.580	6.027	***	P<0.001
LED CONT PRO vs LED DIAB SUP	-45.830	4.075	*	P<0.05
LED CONT PRO vs LED DIAB PRO	-28.460	2.531	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER DIAB SUP	-47.280	4.482	**	P<0.01
LED CONT PRO vs LASER DIAB PRO	-28.180	2.671	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER CONT PRO	13.340	1.326	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	-85.130	8.070	***	P<0.001
LASER CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	-49.830	4.724	**	P<0.01
LASER CONT SUP vs LED DIAB SUP	-32.080	2.853	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LED DIAB PRO	-14.710	1.308	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER DIAB SUP	-33.530	3.178	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER DIAB PRO	-14.430	1.368	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	-98.470	9.334	***	P<0.001
LASER CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	-63.170	5.988	***	P<0.001
LASER CONT PRO vs LED DIAB SUP	-45.420	4.039	*	P<0.05
LASER CONT PRO vs LED DIAB PRO	-28.050	2.494	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs LASER DIAB SUP	-46.870	4.443	**	P<0.01
LASER CONT PRO vs LASER DIAB PRO	-27.770	2.632	ns	P>0.05
PCEBO DIAB SUP vs PCEBO DIAB PRO	35.300	3.204	ns	P>0.05
PCEBO DIAB SUP vs LED DIAB SUP	53.050	4.539	**	P<0.01
PCEBO DIAB SUP vs LED DIAB PRO	70.420	6.026	***	P<0.001
PCEBO DIAB SUP vs LASER DIAB SUP	51.600	4.683	**	P<0.01
PCEBO DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	70.700	6.417	***	P<0.001
PCEBO DIAB PRO vs LED DIAB SUP	17.750	1.519	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LED DIAB PRO	35.120	3.005	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LASER DIAB SUP	16.300	1.479	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LASER DIAB PRO	35.400	3.213	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LED DIAB PRO	17.370	1.410	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LASER DIAB SUP	-1.450	0.1241	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	17.650	1.510	ns	P>0.05
LED DIAB PRO vs LASER DIAB SUP	-18.820	1.610	ns	P>0.05
LED DIAB PRO vs LASER DIAB PRO	0.2800	0.02396	ns	P>0.05
LASER DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	19.100	1.733	ns	P>0.05

ANÁLISE DO NÚMERO DE VASOS

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	11	3302.1	300.19
Residuals (within columns)	52	2834.0	54.499
=====	=====	=====	
Total	63	6136.1	

F = 5.508

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because a sample size is too small.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.579 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
PCEBO CONT SUP vs PCEBO CONT PRO	-5.080	1.192	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED CONT SUP	-6.580	1.544	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED CONT PRO	-7.830	1.837	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER CONT SUP	-5.500	1.290	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER CONT PRO	-8.080	1.896	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	13.950	3.121	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	13.450	3.009	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED DIAB SUP	-4.130	0.8667	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LED DIAB PRO	3.120	0.6547	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER DIAB SUP	-2.850	0.6375	ns P>0.05
PCEBO CONT SUP vs LASER DIAB PRO	1.150	0.2573	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED CONT SUP	-1.500	0.3519	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED CONT PRO	-2.750	0.6452	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER CONT SUP	-0.4200	0.09854	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER CONT PRO	-3.000	0.7039	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	19.030	4.257	** P<0.01
PCEBO CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	18.530	4.145	** P<0.01
PCEBO CONT PRO vs LED DIAB SUP	0.9500	0.1994	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LED DIAB PRO	8.200	1.721	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER DIAB SUP	2.230	0.4989	ns P>0.05
PCEBO CONT PRO vs LASER DIAB PRO	6.230	1.394	ns P>0.05

LED CONT SUP vs LED CONT PRO	-1.250	0.2933	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER CONT SUP	1.080	0.2534	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER CONT PRO	-1.500	0.3519	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	20.530	4.593	**	P<0.01
LED CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	20.030	4.481	**	P<0.01
LED CONT SUP vs LED DIAB SUP	2.450	0.5141	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LED DIAB PRO	9.700	2.036	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER DIAB SUP	3.730	0.8344	ns	P>0.05
LED CONT SUP vs LASER DIAB PRO	7.730	1.729	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER CONT SUP	2.330	0.5467	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER CONT PRO	-0.2500	0.05866	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	21.780	4.872	***	P<0.001
LED CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	21.280	4.760	**	P<0.01
LED CONT PRO vs LED DIAB SUP	3.700	0.7764	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LED DIAB PRO	10.950	2.298	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER DIAB SUP	4.980	1.114	ns	P>0.05
LED CONT PRO vs LASER DIAB PRO	8.980	2.009	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER CONT PRO	-2.580	0.6053	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs PCEBO DIAB SUP	19.450	4.351	**	P<0.01
LASER CONT SUP vs PCEBO DIAB PRO	18.950	4.239	**	P<0.01
LASER CONT SUP vs LED DIAB SUP	1.370	0.2875	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LED DIAB PRO	8.620	1.809	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER DIAB SUP	2.650	0.5928	ns	P>0.05
LASER CONT SUP vs LASER DIAB PRO	6.650	1.488	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs PCEBO DIAB SUP	22.030	4.928	***	P<0.001
LASER CONT PRO vs PCEBO DIAB PRO	21.530	4.816	***	P<0.001
LASER CONT PRO vs LED DIAB SUP	3.950	0.8289	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs LED DIAB PRO	11.200	2.350	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs LASER DIAB SUP	5.230	1.170	ns	P>0.05
LASER CONT PRO vs LASER DIAB PRO	9.230	2.065	ns	P>0.05
PCEBO DIAB SUP vs PCEBO DIAB PRO	-0.5000	0.1071	ns	P>0.05
PCEBO DIAB SUP vs LED DIAB SUP	-18.080	3.651	*	P<0.05
PCEBO DIAB SUP vs LED DIAB PRO	-10.830	2.187	ns	P>0.05
PCEBO DIAB SUP vs LASER DIAB SUP	-16.800	3.598	*	P<0.05
PCEBO DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	-12.800	2.741	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LED DIAB SUP	-17.580	3.550	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LED DIAB PRO	-10.330	2.086	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LASER DIAB SUP	-16.300	3.491	ns	P>0.05
PCEBO DIAB PRO vs LASER DIAB PRO	-12.300	2.634	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LED DIAB PRO	7.250	1.389	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LASER DIAB SUP	1.280	0.2585	ns	P>0.05
LED DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	5.280	1.066	ns	P>0.05
LED DIAB PRO vs LASER DIAB SUP	-5.970	1.206	ns	P>0.05
LED DIAB PRO vs LASER DIAB PRO	-1.970	0.3978	ns	P>0.05
LASER DIAB SUP vs LASER DIAB PRO	4.000	0.8567	ns	P>0.05

ANÁLISE DO NÚMERO DE FIBROBLASTOS

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
-----	-----	-----	-----
Treatments (between columns)	11	10574	961.26
Residuals (within columns)	52	48755	937.60
=====	=====	=====	
Total	63	59329	

F = 1.025

The P value is 0.4383, considered not significant.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because a sample size is too small.

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCEBO CONT SUP	6	112.92	25.303	10.330	Unknown
PCEBO CONT PRO	6	91.080	31.280	12.770	Unknown
LED CONT SUP	6	122.67	33.705	13.760	Unknown
LED CONT PRO	6	113.50	35.518	14.500	Unknown
LASER CONT SUP	6	120.75	28.757	11.740	Unknown
LASER CONT PRO	6	114.75	31.549	12.880	Unknown
PCEBO DIAB SUP	5	80.300	34.435	15.400	Unknown
PCEBO DIAB PRO	5	90.900	31.394	14.040	Unknown
LED DIAB SUP	4	98.380	29.680	14.840	Unknown
LED DIAB PRO	4	102.75	26.280	13.140	Unknown
LASER DIAB SUP	5	97.000	25.379	11.350	Unknown
LASER DIAB PRO	5	100.20	29.941	13.390	Unknown

ANÁLISE QUALITATIVA

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	71.857	14.371
Residuals (within columns)	26	47.631	1.832
=====	=====	=====	
Total	31	119.49	

F = 7.845

The P value is 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because a sample size is too small.

Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.231 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
PLACEBO CONTR vs LED CONTROLE	-2.170	2.777	ns P>0.05
PLACEBO CONTR vs LASER CONTROLE	-2.250	2.879	ns P>0.05
PLACEBO CONTR vs PLACEBO DIABET	2.180	2.660	ns P>0.05
PLACEBO CONTR vs LED DIABETICO	-0.8000	0.9157	ns P>0.05
PLACEBO CONTR vs LASER DIABETIC	-0.6200	0.7565	ns P>0.05
LED CONTROLE vs LASER CONTROLE	-0.08000	0.1024	ns P>0.05
LED CONTROLE vs PLACEBO DIABET	4.350	5.308	*** P<0.001
LED CONTROLE vs LED DIABETICO	1.370	1.568	ns P>0.05
LED CONTROLE vs LASER DIABETIC	1.550	1.891	ns P>0.05
LASER CONTROLE vs PLACEBO DIABET	4.430	5.405	*** P<0.001
LASER CONTROLE vs LED DIABETICO	1.450	1.660	ns P>0.05
LASER CONTROLE vs LASER DIABETIC	1.630	1.989	ns P>0.05
PLACEBO DIABET vs LED DIABETICO	-2.980	3.282	* P<0.05
PLACEBO DIABET vs LASER DIABETIC	-2.800	3.271	* P<0.05
LED DIABETICO vs LASER DIABETIC	0.1800	0.1982	ns P>0.05