



ARTIGO

Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência

Taciane Stein da Silva¹, Fernanda Mendes¹, Ângela Maria Pereira Alves²,
Éder Paulo Belato Alves² e Gladson Ricardo Flor Bertolini^{1*}

Recebido: 01 de outubro de 2009

Recebido após revisão: 09 de março de 2010

Aceito: 21 de junho de 2010

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1396>

RESUMO: (Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência). A participação em esportes tem se tornado cada vez mais popular e lesões cutâneas causadas pela prática de atividade física também. A fisioterapia busca tratar essas lesões e seu principal objetivo é reduzir o tempo de cicatrização. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos microscópicos do laser de baixa potência, 670 nm, na evolução do processo cicatricial de lesões cutâneas induzidas em ratos adultos e comparar os efeitos entre duas doses de energia. Foram utilizados 15 ratos Wistar, divididos em três grupos: GC (n=5), grupo controle; G2J (n=5), grupo com uso da laserterapia com intensidade de 2 J/cm²; G4J (n=5), grupo com uso de 4 J/cm². Para a realização da lesão, circundou-se um molde em EVA, retirou-se a pele da região cervicodorsal do animal com uso de bisturi cirúrgico, sendo feitas duas lesões semelhantes próximas às escápulas (1 cm²). O tratamento foi realizado durante 10 dias consecutivos, a partir do dia da lesão, na lesão próxima à escápula direita. A dose de energia foi depositada de forma pontual nos vértices da lesão. Os resultados em relação à língua de reepitelização mostraram que somente o G4J apresentou diferença significativa. No que diz respeito ao número de células em metáfase, não foi encontrado diferença significativa entre os grupos tratados e controle. Pode-se concluir que o tratamento com laser, na dosimetria instituída neste estudo, não foi eficaz em aumentar o número de células em metáfase. Contudo, na dose de 4J/cm², houve efeito positivo verificado pela medida da língua de reepitelização.

Palavras-chave: laser de baixa potência, cura de feridas, pele.

ABSTRACT: (Microscope study of rats skin tissue injury and treated with low level laser therapy). The participation in sports has become increasingly popular, and skin lesions caused by physical activity as well. Physical therapy seeks to address these injuries and their main goal is to reduce the healing time. The aim of this study was to analyze the effects of microscopic low level laser therapy, 670 nm, in the healing process of skin lesions induced in adult rats and to compare the effects of two energy doses. A total of 15 rats were divided into three groups: GC (n = 5) control group; G2J (n = 5) group using the laser with an intensity of 2 J/cm²; G4J (n = 5) with the use of group 4 J/cm². For the lesion procedure, surrounded by a cast in EVA, withdrew from the animal skin in the cervicodorsal region using surgical scalpel, and made two similar lesions near the scapulae (1 cm²). The treatment was performed for 10 consecutive days from the injury date; the lesion near the right scapula, the dose of energy was deposited in the lesion corners. The results on the reepithelialization tongue showed that the only significant difference G4J. Regarding the metaphase cells number was not found significant difference between treated and control groups. We concluded that treatment with laser in the established dosimetry in this study was not effective in increasing the metaphase cells number. However, was verified positive effect with the dose of 4J/cm² by measuring the reepithelialization tongue.

Key words: low level laser therapy, wound healing, skin.

INTRODUÇÃO

A participação em atividades esportivas tem se tornado cada vez mais popular. Durante a maior parte das formas de exercício, os tecidos e seus anexos estão sob constante trauma e agressões por fatores ambientais, que podem causar ferimentos. A participação em esportes muitas vezes resulta em prejuízo para a pele, especialmente a pele dos pés (Pharis *et al.* 1997).

A principal causa de lesão traumática da pele de atletas é causada pelos equipamentos e essas lesões consistem em bolhas, calos, infecções, condições inflamatórias e processos ulcerativos cutâneos. Embora a maioria dessas afecções seja benigna, elas afetam diretamente o desempenho do atleta (Savage & Adams 2006).

Nos últimos anos, a fisioterapia vem se destacando

como um meio para tratamento de processos ulcerativos e seu principal objetivo é reduzir o tempo de cicatrização, tornando possível um retorno mais rápido do indivíduo às suas atividades (Say *et al.* 2003). O laser de baixa intensidade constitui-se, atualmente, em uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na fisioterapia (Al-Watban & Delgado 2005, Carvalho *et al.* 2003, Gál *et al.* 2006).

O laser tem a capacidade de promover alterações físicas e biológicas que podem ajudar na resolução do processo inflamatório, concomitantemente atuando na cicatrização por meio da reepitelização, aceleração das mitoses e estímulo à produção de adenosina trifosfato. Pelos efeitos secundários, proporciona estímulo à microcirculação por meio de mediadores químicos (Carvalho *et al.* 2003, Karu 1989, Ortiz *et al.* 2001, Rocha 2004).

1. Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Campus Cascavel. Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, Caixa Postal 711, CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil.

2. Laboratório de Histologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Campus Cascavel.

* Autor para contato. E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

O objetivo deste estudo consistiu em analisar os efeitos microscópicos do laser de baixa potência e comparar os efeitos entre duas doses de energia irradiada (2 e 4 J/cm²) na evolução do processo cicatricial de lesões cutâneas induzidas em ratos adultos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo e amostra

Foram utilizados 15 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com idade de 12 ± 2 semanas, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Os animais foram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, em grupos de 2 ou 3 animais, mantidos em fotoperíodo de 12 h, com água e ração *ad libitum*. O projeto foi conduzido segundo as Normas Internacionais de Ética em Experimentação Animal (Andersen *et al.* 2004).

Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, sendo:

Grupo controle (GC, n = 5): lesionados e não irradiados, tratados com aparelho desligado;

Grupo 2 Joules (G2J, n = 5): lesionados e irradiados com laser (670nm) de baixa potência, com dose de 2 J/cm²;

Grupo 4 Joules (G4J, n = 5): lesionados e irradiados com laser (670nm) de baixa potência, com dose de 4 J/cm².

Indução da lesão

Os animais foram anestesiados por meio de uma injeção intraperitoneal da associação de Ketamina (35 mg/kg) e Xilazina (4 mg/kg). Após a tricotomia local, delineou-se a área da lesão com auxílio de um molde padrão de EVA de aproximadamente 1cm². O corte e a retirada do tecido cutâneo demarcado foi realizado com um bisturi lâmina quinze. Em cada animal, a lesão foi realizada na região dorsal do animal, sendo feitas duas lesões semelhantes próximas às escapulas direita e esquerda.

Tratamento

No tratamento das lesões experimentais, foi utilizado um laser modelo portátil, marca Bioset®. A caneta utilizada apresentava comprimento de onda de 670 nm, com potência óptica de saída de 30 mW, emissão contínua. O aparelho utilizado foi previamente aferido para certificação da dose utilizada.

O tratamento iniciou-se imediatamente após o processo operatório e se estendeu por nove dias, totalizando dez sessões em que cada grupo recebeu a irradiação pré-determinada. Somente a lesão direita foi tratada, a lesão esquerda teve a finalidade de controle para possíveis efeitos sistêmicos do laser.

A dose da irradiação foi depositada de forma pontual, sempre nos vértices da lesão, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao ponto irradiado em contato com as bordas das feridas, com os animais contidos manualmente durante o tratamento (Fig. 1).

Ao término do experimento, a eutanásia dos animais foi realizada por decapitação, seguindo a dissecação dos tecidos lesados.

Preparo das lâminas e análise histológica

No décimo dia, duas horas antes do último tratamento e eutanásia, os animais receberam intraperitonealmente, 0,5 mg/kg de sulfato de vincristina (Oncovin Lilly®), que resulta na interrupção da mitose e bloqueio das células em metáfase, por meio de ligações com a proteína tubulina.

O material dissecado seguiu os passos para processamento histológico de rotina, para coloração em hematoxilina e eosina (HE), e os cortes foram realizados em micrótomo rotativo da marca Olympus®, na espessura de 6 µm.

Análise da migração celular epitelial

A análise da migração celular epitelial foi realizada por meio da medida da língua de reepitelização, com o auxílio de uma régua de 100 µm acoplada ao microscópio da marca Olympus® CBA, na objetiva de 40X, traçando-se uma reta paralela à língua de reepitelização. Foram analisadas 10 superfícies reepitelizadas de cada lesão.

Análise microscópica da Proliferação celular epitelial

Foram realizados dez cortes de cada lesão, analisados em microscópio Olympus® CBA, com objetivas de 100X. A análise da proliferação celular da epiderme foi realizada pela contagem das células epiteliais bloqueadas em metáfase, ao longo de toda a língua de reepitelização.

Análise estatística

Após a verificação da normalidade dos dados estatísticos com o teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram comparados intra-grupos por meio do teste *t* de Student pareado e comparação inter-grupos com o teste *t* de Student não-pareado. Todas as análises estatísticas foram feitas com nível de significância de 5%.



Figura 1. Tratamento com laser de baixa potência, em um dos vértices da lesão em pele, com o animal contido manualmente.

RESULTADOS

Comprimento da língua de reepitelização

Analisando-se a média do desenvolvimento da língua de reepitelização (Fig. 2), deixa-se claro que os animais tratados com irradiação laser de 4 J/cm² apresentaram uma maior velocidade de cicatrização das lesões, mostrando-se que a dose de 4 J/cm² de laser foi eficiente para essas lesões, com diferença significativa dos dados encontrada somente para G4J.

Na comparação inter-grupos, para o comprimento da língua de reepitelização, não foi encontrada diferença significativa.

Número de células em metáfase

Não houve diferença estatística para nenhum grupo, com relação ao número de células em metáfase, ao comparar as lesões direitas com as esquerdas (Fig. 3).

Na comparação inter-grupos, não foi encontrada diferença significativa no que diz respeito ao número de células em metáfase.

DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizou-se o modelo experimental animal para a indução da lesão tecidual, com o objetivo de padronizar algumas características intrínsecas das lesões, como área, profundidade e localização, características estas difíceis de encontrar em um modelo experimental humano. Optou-se por realizar a lesão na região cervicodorsal, por ser uma área de difícil acesso ao animal, dificultando o auto ferimento.

A laserterapia de baixa intensidade utiliza-se de energia física não invasiva com o intuito de melhorar os processos de cicatrização, regeneração muscular, controle da dor, reparo ósseo e nervoso. Um dos objetivos da laserterapia de baixa intensidade é modular a quantidade e qualidade de processos biológicos relacionados à recuperação da homeostasia durante o reparo tecidual (Al-Watban & Zhang 2004, Reddy 2003, Say *et al.* 2003).

O laser utilizado no presente estudo apresenta um

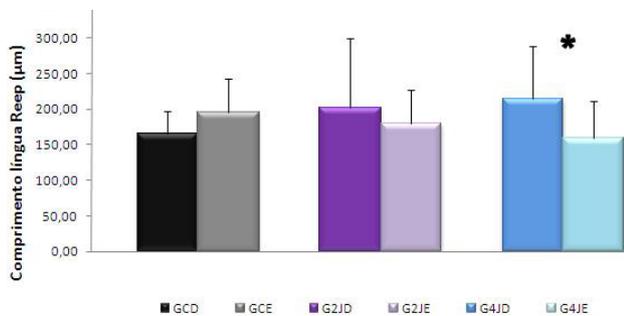


Figura 2. Média do comprimento da língua de reepitelização. A medida foi realizada em micrômetros, de acordo com os grupos, para as lesões direita e esquerda. * Diferença estatisticamente significativa ao comparar o lado direito com o esquerdo de G4J, utilizando o teste *t* de Student pareado. Não foram observadas diferenças entre os grupos ao utilizar o teste *t* não pareado.

comprimento de onda de 670 nm correspondente à faixa do vermelho e, assim, uma penetração tecidual menor, ideal para tratamento de úlceras cutâneas. As densidades de energia utilizadas no trabalho foram de 2 e 4 J/cm², visto que estas apresentam efeitos analgésicos e de cicatrização (Carvalho *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2002, Say *et al.* 2003, Siqueira *et al.* 2004).

Os efeitos fotobiológicos da radiação laser podem convencionalmente ser divididos em curto e longo prazo. As respostas em curto prazo são aquelas nas quais o efeito pode ser observado poucos segundos ou minutos após a irradiação. Os efeitos observados em longo prazo são aqueles que ocorrem horas ou ainda dias após o final da irradiação e, usualmente, envolvem nova biossíntese celular (Al-Watban & Zhang 2004, Carvalho *et al.* 2003, Karu 1987, Ortiz *et al.* 2001, Pereira *et al.* 2002, Reddy 2003, Siqueira *et al.* 2004). Os resultados esperados, para o trabalho aqui apresentado, são baseados neste último efeito, em longo prazo.

Há muito tempo a radiação laser é usada para acelerar a cicatrização de úlceras e as radiações da parte vermelha do espectro visível são as que têm mostrado mais eficácia. Em seu estudo, Carvalho *et al.* (2003) demonstraram que o efeito mais importante do laser de baixa intensidade, sobre o processo de cicatrização de lesões, foi o aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos.

Ainda em relação ao que diz respeito à aceleração da biossíntese celular, Karu (1987) relata que a irradiação de fibroblastos humanos com um laser de He-Ne aumentou significativamente o número de células em comparação com seus respectivos controles não irradiados. Tais dados indicam que a irradiação laser pode provocar um rearranjo no metabolismo celular, acelerando as proliferações celulares e tendo como resposta final o aumento da mitose. Porém, para a presente pesquisa, o número de células bloqueadas em metáfase não foi estatisticamente significativo para nenhum grupo, provavelmente devido o tempo de tratamento, já que no décimo dia as atividades proliferativas não são tão evidentes. Este resultado talvez seja explicado pelo trabalho de Kreisler *et al.* (2002), que demonstrou que o pico da taxa de divisão celular

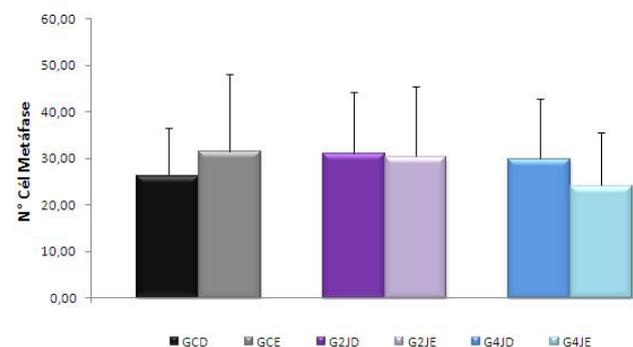


Figura 3. Número de células em metáfase para as lesões direita e esquerda. Não foram observadas diferenças significativas dentro dos grupos, por meio do teste *t* de Student pareado, nem diferenças entre os grupos ao utilizar o teste *t* não pareado.

ocorre no intervalo de 24 a 48 horas. Após isso, existe um decréscimo da taxa de proliferação celular.

AL-Watban e Delgado (2005) demonstraram que o comprimento de onda e a densidade de energia são fatores preponderantes para o sucesso da laserterapia, no que tange à cicatrização de lesões, sendo que densidades muito altas ou muito baixas não apresentam resultados favoráveis. O trabalho de Schaffer *et al.* (1997) apresentou um aumento do índice mitótico das células normais, depois da aplicação de 4 J/cm². Contrariamente, uma fluência de 20 J/cm² determinou uma ligeira diminuição do índice mitótico para células normais. Portanto, um baixo nível de irradiação promove um efeito estimulante, enquanto efeito inibitório aparece induzido por um alto nível de irradiação.

Embasado nos estudos acima citados, apesar de não ter-se evidenciado nos grupos tratados resultados significativos para o número de células em metáfase, ainda assim foi evidenciado um resultado positivo no tamanho da língua de reepitelização, podendo-se concluir que a dose de 4 J/cm² mostrou-se eficiente para o processo de reparo tecidual.

A literatura ainda é bastante conflitante a respeito dos efeitos bioestimulantes do laser de baixa intensidade na cicatrização. Allendorf *et al.* (1997) desenvolveram um trabalho que utilizou a irradiação laser He-Ne, com doses de 1, 2 e 4 J/cm², em úlceras induzidas, com o objetivo de estudar os efeitos bioestimuladores desta energia. Porém, não conseguiram demonstrar nenhum efeito mensurável da irradiação laser sobre o processo de cicatrização das úlceras. Em contrapartida, Carvalho *et al.* (2003), comparando os efeitos da laserterapia na regeneração tecidual de lesões cutâneas pela análise morfométrica do percentual de fibras colágenas de úlceras tratadas com laser dose de 4 J/cm², chegaram a conclusão que quando a laserterapia de HeNe é aplicada, há um incremento do processo cicatricial, mostrando-se assim eficiente no tratamento de úlceras, acelerando o reparo.

O resultado encontrado no presente trabalho, ao analisar a contagem de células e a dose de 2 J/cm², confirmam os achados de Allendorf *et al.* (1997), justificando-se desta forma a falta de significância estatística do uso do laser no processo cicatricial das úlceras. Porém, mesmo com a falta de significância estatística dos resultados da contagem das células em metáfase, a reparação das lesões ocorreu de uma forma normal e esperada em todos os animais, possivelmente devido à característica da reepitelização rápida dessas lesões. Por apresentarem uma etiologia definida, nenhum quadro associado que pudesse atrasar o processo de cicatrização ocorreu, como uma infecção associada ou quaisquer fatores predisponentes para as úlceras.

CONCLUSÃO

A análise do tratamento com laser na dosimetria instituída neste estudo não foi eficaz em aumentar o número de células em metáfase. Porém, para a presente pesquisa,

na dose de 4 J/cm², os resultados encontrados apresentaram efeito positivo, no que tange à acelerar o processo de cicatrização, verificado por meio da mensuração da língua de reepitelização.

REFERÊNCIAS

- ALLENDDORF, J. D. F., BESSLER, M., HUANG, J., KAYTON, M. L., LAIRD, D., NOWYGRAD, R. & TREAT, M. R. 1997. 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. *Laser Surg Med*, 20: 340-345.
- AL-WATBAN, F. A. H. & DELGADO, G. E. 2005. Burn healing with a diode laser: 670 nm at different doses as compared to a placebo group. *Photomed Laser Surg*, 23: 245-250.
- AL-WATBAN, F. A. H. & ZHANG, X. Y. 2004. The comparison of effects between pulsed and cw. lasers on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*, 22: 15-18.
- ANDERSEN, M. L., D'ALMEIDA, V., KO, G. M., KAWAKAMI, R., MARTINS, P. J., MAGALHÃES, L. E. & TUFIK, D. 2004. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP.
- CARVALHO, P. T. C., MAZZER, N., SIQUEIRA, J. F. R., FERREIRA, J. V. L. & SILVA, I. S. 2003. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe. *Fisioterapia Brasil*, 4: 253-258.
- CARVALHO, P. T. C., SILVA, R. R. & SILVA, R. J. 2003. Estudo microbiológico *in vitro* do crescimento bacteriano após aplicação laser HeNe em úlceras de decúbito com infecção bacteriana. *Fisioterapia Brasil*, 2: 183-188.
- GÁL, P., VIDINSKY, B., TOPORCER, T., MOKRY, M., MOZES, S., LONGAUER, F. E. & SABO, J. 2006. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg*, 24: 480-488.
- KARU, T. 1987. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron*, 10: 1703-1717.
- KARU, T. 1989. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*, 56: 691-707.
- KREISLER, M., CHRISTOFFERS, A. B., WILLERSHAUSEN, B. & HORDT, B. 2002. Low-level 809 nm diode laser induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Laser Surg Med*, 30: 365-369.
- ORTIZ, M. C. S., CARRINHO, P. M., SANTOS, A. A. S., GONÇALVES, R. C. & PARIZOTTO, N. A. 2001. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisioterapia Brasil*, 2: 221-240.
- PEREIRA, A. N., EDUARDO, C. D., MATSON, E. & MARQUES, M. M. 2002. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Laser Surg Med*, 31: 263-267.
- PHARIS, D. B., TELLER, C. & WOLF, J. E. 1997. Cutaneous manifestations of sports participation. *J Am Acad Dermatol*, 36: 448-459.
- REDDY, G. K. 2003. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Laser Surg Med*, 33: 344-351.
- ROCHA, J. C. T. 2004. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *Rev Bras Prom Saúde*, 17: 44-48.
- SAVAGE, E. A. M. & ADAMS, B. B. 2006. Skin manifestations of running. *J Am Acad Dermatol*, 55: 290-301.
- SAY, K. G., GONÇALVES, R. C., RENNÓ, A. C. M. & PARIZOTTO, N. A. 2003. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Fisioterapia Brasil*, 4: 40-49.
- SCHAFFER, M., SROKA, R., FUCHS, C., SCHRADER-REICHARDT, U., SCHAFFER, P. M., BUSCH, M. & DÜHMKE, E. 1997. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. *J Photochem Photobiol B*, 40: 253-257.
- SIQUEIRA, F. C. H. N., REINERT, T. C., CORREA, K. P., KOTZ, J. C. & BERTOLINI, G. R. F. 2004. Uso do laser de baixa intensidade, AsAl-Ga, 830 nm, em pacientes portadores de úlceras de pressão. *Reabilitar*, 6: 10-15.