



Ministério da Educação
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
Minas Gerais – Brasil
Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas
Reg.: 120.2.095–2011 – UFVJM
ISSN: 2238-6424
Nº. 03 – Ano II – 05/2013
<http://www.ufvjm.edu.br/vozes>

Cicatrização de feridas cutâneas em ratos após terapia laser de baixa intensidade (660nm)

Prof^a. Dr^a. Cynthia Fernandes Ferreira Santos
Doutora em Fisiologia e Farmacologia; Núcleo de Experimentação Animal/
Departamento de Ciências Básicas/ UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9549549619743375>
E-mail: cynthia.professora@gmail.com

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Santos
Doutora em Neurociências; Núcleo de Experimentação Animal/ Departamento de
Fisioterapia/ UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5486738488474310>
E-mail: apsfisio@hotmail.com

Prof^a. Dr^a. Thais Gaiad Peixoto Machado
Doutora em Ciências; Núcleo de Experimentação Animal/ Departamento de
Fisioterapia/ UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5310768544541654>
E-mail: thaispgm@gmail.com

Núbia Carelli Pereira de Avelar
Doutoranda em Ciências Fisiológicas na Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri / UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5333085736778263>
E-mail: nubia-carelli@ig.com.br

Prof. Dr. Murilo Xavier Oliveira
Doutor em Engenharia Biomédica; Núcleo de Experimentação Animal/
Departamento de Fisioterapia / UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6813458883512246>
E-mail: muriloxavier@ufvjm.edu.br

Thaíssa Cerqueira de Almeida
Discente em Fisioterapia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5090733872726225>
E-mail: thaissa.almeida@gmail.com

Ana Flávia Alves França
Discente em Fisioterapia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3071571907768656>
E-mail: anaflaviafranca@gmail.com

Viviane Araújo Pires
Graduada em Fisioterapia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6817396448237172>
E-mail: vipires@hotmail.com

Resumo: O objetivo do estudo foi analisar o efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade (TLBI) (660nm) na velocidade da cicatrização de feridas cutâneas em ratos. A amostra consistiu de 12 ratos machos Wistar. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: grupo Controle e grupo Laser. A ferida cutânea foi realizada sob anestesia por meio de uma incisão cirúrgica realizada com um *punch* de 12mm². As fotografias foram realizadas no 1º, 8º, 15º e 19º dias. As imagens foram analisadas por meio do software *ImageJ* para a definição das áreas das feridas e para o cálculo do Índice de Contração das Feridas. Observou-se através deste índice que entre o 8º e o 15º dia o grupo Laser obteve uma contração da ferida mais rápida que o grupo Controle, sendo significativamente maior ($p < 0.01$). Concluiu-se que a TLBI (660nm) pode ser capaz de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, principalmente na fase proliferativa da cicatrização.

Palavras-chave: Fototerapia. Fotogrametria. Cicatrização tecidual.

Introdução

Ferida é uma lesão física corporal caracterizada pela ruptura da continuidade normal das estruturas do corpo (HUSSEIN *et al.*, 2011, p. 193-197). A cicatrização de uma ferida consiste na reconstrução do local, a fim de restaurar a sua integridade e a função normal (TACON *et al.*, 2011, p. 373-378). É um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesado (MENDONÇA, COUTINHO-NETTO, 2009, p. 257-262).

Formas de tratamento como aplicação local de diferentes produtos químicos têm sido pesquisadas a fim de verificar sua contribuição para a melhora na cicatrização. (GÜNTER, MACHENS, 2012, p. 16-23; TARAMESHLOO *et al.*, 2012, p. 170-177). Também têm sido investigado o uso de correntes elétricas (HOUGHTON *et al.*, 2003, p. 17-28; DAVINI *et al.*, 2005, p. 249-256), ultrassom (JORGE, 2009; OLSSON *et al.*, 2008, p. 1199-1207; MENDONÇA *et al.*, 2006, p. 152-157), infravermelho (TOYOKAWA *et al.*, 2003, p. 724–729) e recentemente a fototerapia utilizando Light Emitting Diode (LED) (MEYER, *et al.*, 2010, p. 428-432; CASALECHI, *et al.*, 2008, p. 659-665) ou terapia laser de baixa intensidade (TLBI) (CARVALHO, *et al.*, 2006, p. 177-183; CHUNG, PELOW, BAXTER, 2010, p. 251-261).

A TLBI é um termo genérico que define a aplicação de laser com baixas densidades de potência e energia (TACON *et al.*, 2011, p. 373-378). Os efeitos terapêuticos do laser em diferentes tecidos biológicos são extensos. Estes têm sido demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*, e incluem efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos (CARVALHO *et al.*, 2006, p. 177-183). Exerce também um importante efeito sobre o processo ulcerativo, resultando na redução do tempo de cicatrização (SILVEIRA *et al.*, 2009, p. 281-287).

Alguns estudos evidenciaram os efeitos benéficos da fototerapia de baixa intensidade ao tratar feridas. Entre eles, Gonçalves *et al.* (2010, p. 350-355) utilizaram a TLBI em dois comprimentos de ondas diferentes: no comprimento de onda de 830 nm com 2 densidades de energia: 30 J/cm² e 60 J/cm² e comprimento de onda de 904 nm com a densidade de energia de 4 J/cm² e verificaram o aumento de colágenos tipo I e III. Chung *et al.* (2010, p. 251-261) realizaram um estudo onde utilizaram o comprimento de onda 660 nm em potências de 18 mW e de 80 mW e confirmam que houve um aceleração do processo de cicatrização por meio da reepitelização e formação de tecido de granulação. Hussein *et al.* (2011, p. 193-197) utilizaram em seus estudos um comprimento de onda de 890 nm e obtiveram aumento da regeneração e cicatrização mais rápida com restauração da integridade funcional e estrutural.

Entretanto, ainda observa-se uma lacuna na literatura a cerca dos parâmetros ideais de aplicação do laser, sendo assim, necessários mais estudos para defini-los para uma melhor aplicabilidade clínica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi

analisar o efeito da TLBI (660nm) na velocidade da cicatrização de feridas cutâneas em ratos por meio da fotogrametria.

1. Métodos

1.1. Aspectos Éticos

Para a realização deste estudo foram seguidas as premissas da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e protocolos aprovados pelo CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA – UFVJM) sob parecer nº 013/11.

1.2. Grupos Experimentais

A amostra consistiu de 12 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso corporal 280 ± 35 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle (n= 6) e Grupo Laser (n= 6). Os animais foram acomodados em caixas apropriadas de polipropileno com 3 animais em cada, sendo fornecida água e ração à vontade.

1.3. Procedimento para realização da ferida cutânea

O procedimento cirúrgico para produção da ferida cutânea foi realizado sob anestesia por meio da aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10%, e de cloridrato de xilazina 2%, no volume de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo, com a utilização de seringa de insulina de 1ml. Foi realizada uma tricotomia no dorso do animal, e em seguida a incisão cirúrgica foi feita com um *punch* de 12mm², utilizando-se a linha média dorsal como referência, e que inclui a epiderme, derme e fáscia dorsal. A profundidade do ferimento da pele foi padronizada em função da visualização do plano muscular. Cada animal foi identificado na cauda, utilizando uma caneta dermográfica.

1.4. Fototerapia

Os animais do grupo Laser receberam aplicação de laser InGaAIP (660 ± 10 nm) com densidade de energia de 10 J/cm^2 , em uma área de aproximadamente 12 mm^2 , com duração de 10 segundos por ferida. O laser foi utilizado em modo contínuo com potência de 40 mW e área de saída do feixe de 2 cm^2 . Os animais foram posicionados manualmente em decúbito ventral, seguindo-se a aplicação da luz. Foi utilizada uma película de plástico transparente por cima da ferida para a aplicação do laser. A aplicação foi pontual sobre a área da ferida, formando um ângulo de 90° . A irradiação foi realizada logo após o procedimento cirúrgico, e foi mantida por meio de aplicações diárias, cinco vezes por semana, durante 3 semanas.

1.5. Modelo de eutanásia

Os animais foram anestesiados com uma aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10%, e de cloridrato de xilazina 2%, no volume de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo, seguido de aplicação do cloreto de potássio 19,1% (Equiplex) via intracárdica com dose única de 0,4ml para cada 100g de peso corpóreo.

1.6. Cálculo da Área da Ferida

A cada semana era realizada uma fotografia digital das feridas de todos os animais utilizando uma câmera digital da marca Kodak, modelo EasyShare C813, 8.2 megapixels. As fotografias foram realizadas no 1º dia, 8º dia, 15º dia e 19º dia. As imagens foram analisadas por meio do software *ImageJ* para a definição das áreas das feridas.

1.7. Índice de Contração da Ferida

O índice de contração foi calculado a partir das áreas das feridas utilizando a seguinte fórmula: Área inicial da ferida (A_o) – Área no dia da mensuração (A_i) / Área inicial da ferida (A_o) x 100.

1.8. Análise Estatística

Foi realizado o teste de Anova Two Way para identificar a diferença das áreas das feridas entre os grupos. Após o calculado o índice de Contração da Ferida foi realizado o Delta entre cada momento para ver a evolução da cicatrização, ambos considerando o nível de significância de 5%.

2. Resultados

A tabela 01 mostra os valores das médias das áreas das feridas dos grupos controle e tratado. Foi possível observar que desde o 1º dia as feridas do grupo Laser estavam maiores em comparação com o grupo Controle, permanecendo assim no 8º dia, porém no 15º já não havia mais diferença significativa entre os grupos e no 19º dias as feridas de ambos os grupos já estavam praticamente fechadas.

Fotogrametria	Controle	Laser	Diferença
Dia 01	0,9520	1,126	0,1740*
Dia 08	0,4293	0,6798	0,2505**
Dia 15	0,03767	0,0630	0,02533
Dia 19	0,0085	0,01817	0,009667

Tabela 1- Média das áreas das feridas dos grupos Controle e Laser (cm²).
*p<0.01; **p<0.001

A Figura 01 e a Tabela 02 expressam os valores do delta dos Índices de Contração das Feridas entre os dias. Na comparação entre as fotografias tiradas no 8º dia e no 15º dia do estudo, observamos que houve uma diferença significativa entre o grupo Laser e Controle, ou seja, nesta fase o grupo Laser obteve uma contração da ferida mais rápido que o grupo Controle.

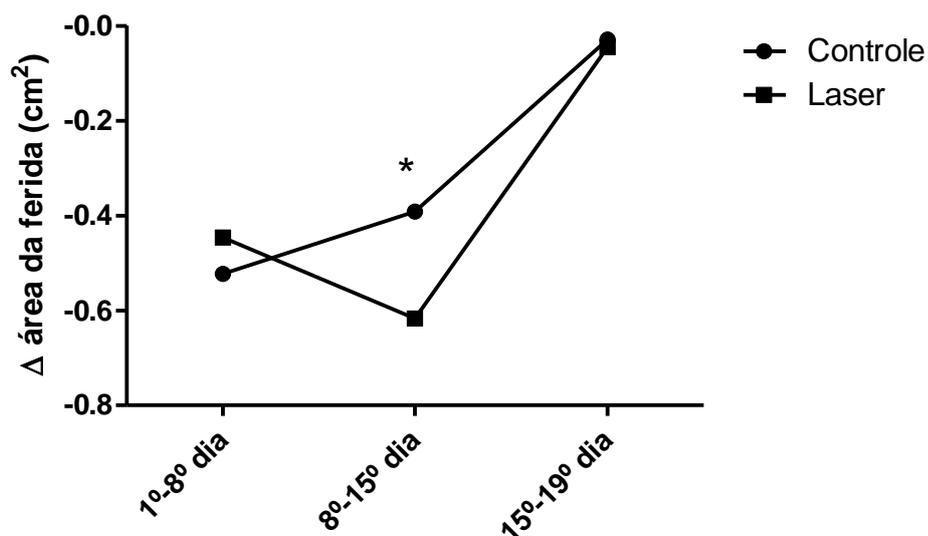


Figura 1- Média do delta entre as áreas das feridas.

	Controle	Laser	Diferença
Delta 1-8	-0,5227	-0,4462	0,07650
Delta 8-15	-0,3917	-0,6168	-0,2252*
Delta 15-19	-0,02917	-0,04483	-0,01567

Tabela 2 – Delta do Índice de Contração das Feridas (cm²). *p<0.01

3. Discussão

A TLBI tem sido usada clinicamente em tecidos moles em muitos países para acelerar a cicatrização de feridas e para controlar dor (NICOLA, *et al.*, 2003, p. 89-94). Esta modula processos metabólicos celulares, que leva a um aumento do potencial regenerativo dos tecidos biológicos (HENRIQUES, *et al.*, 2010, p. 295-302). Estudos prévios têm reportado os efeitos fisiológicos do laser na cicatrização de feridas por meio da aceleração da angiogênese, proliferação do tecido granular e redução de substâncias inflamatórias (CARVALHO, *et al.*, 2006, p. 177-183; SILVEIRA, *et al.*, 2009, p. 281-287). Entretanto esta é uma área controversa pelo conflito de resultados, justificando a necessidade de identificar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica.

Neste estudo foram investigados os efeitos da TLBI na cicatrização de feridas cutâneas utilizando a intensidade de 10 J/cm². Alguns estudos sugerem que os efeitos bioestimuladores do laser apenas ocorrem nas intensidades entre 0,05 e 10J/cm² (ABERGEL, *et al.*, 1987, p. 127–133; MESTER, MESTER, MESTER, 1985, p. 31–39; GOODSON, HUNT, 1979, p. 600–608). Porém de acordo com (ENWEMEKA, 2004, p. 323-329; WOODRUFF, 2004, p. 241,247), as densidades entre 19 e 24 J/cm² obtiveram os melhores resultados na cicatrização de feridas e as densidades abaixo de 8,25/cm² e acima de 130J/cm² não produziram um bom resultado na cicatrização.

Os resultados da observação experimental do presente estudo evidenciaram que o Delta de contração da ferida na 2^a e 3^a análise da fotogrametria, fase proliferativa da cicatrização, foi maior no grupo laser quando comparado com o grupo controle. A partir do 8^o dia notou-se pela fotogrametria que o grupo Laser apresentou uma cicatrização acelerada e este é um resultado similar ao obtido em um recente estudo, onde (TACON *et al.*, 2011, p. 373-378) utilizaram o laser (660nm, 3J/cm² e 6J/cm²) em feridas cutâneas em ratos, onde constataram um aumento da angiogênese e diminuição do infiltrado de polimorfonucleares e hemorragia no 5^o dia.

O comprimento de onda utilizado foi o de 660nm e se mostrou eficaz para atingir o objetivo desta pesquisa. Outros autores também alcançaram resultados parecidos utilizando comprimentos de onda similares. Segundo (CARVALHO *et al.*,

2006, p. 177-183), o laser de baixa potência (632,8 nm) se mostrou capaz de influenciar o percentual de colágeno em feridas cutâneas, aumentando a média de fibras colágenas. Albertini *et al.* (2007, p. 50-55) concluíram que os comprimentos de onda de 660nm e 684nm foram efetivos para redução de edema e migração de células inflamatórias em modelo de inflamação de pata.

Uma das limitações do estudo foi que houve uma diferença de 0,174 cm² de diâmetro nas feridas entre o grupo Controle e o grupo Laser. O grupo Controle teve uma média de área de 0,952 cm² e no grupo Laser a média foi de 1, 126 cm² nas feridas no primeiro dia.

Como as análises deste estudo foram feitas por fotogrametria, ou seja, análise macroscópica, não foi possível analisar os tecidos biológicos microscopicamente para melhor detalhamento da cicatrização. Deste modo, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas no formato supracitado. Contudo mais estudos são necessários para demonstrarem os parâmetros mais eficientes para a cicatrização das feridas

Conclusão

Conclui-se com o presente estudo que a fototerapia de baixa intensidade (660nm) pode ser capaz de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, principalmente, na fase proliferativa.

Abstract: The aim of this study was to analyze the effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) (660nm) on velocity of wound healing in rats. The sample consisted of 12 male Wistar rats. The animals were randomly divided into 2 groups: Control group and Laser. The skin wound was performed under anesthesia through a surgical incision made with a punch of 12mm². The pictures were taken at 1st, 8th, 15th and 19th day. Images were analyzed by ImageJ software for the definition of wound areas and for calculating the Wound Contraction Index. It was observed through this index that between the 8th and 15th of the Laser Group obtained a wound contraction more faster than Control group, it was significantly higher ($p < 0.01$). It is concluded that LLLT (660nm) may be able to accelerate the healing of skin wounds in rats, particularly in proliferative phase of wound healing.

Key-words: Phototherapy. Photogrammetry. Tissue healing.

Referências

ABERGEL, R. P, *et al.* Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v. 13, n. 2, p. 127–133, 1987.

ALBERTINI, R. *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, n. 1, p. 50-55, 2007.

CARVALHO, P. T. C., *et al.* Análise da influência do laser de baixa potência (HeNe) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos e não diabéticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 177-183, 2006.

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

CHUNG, T. Y., PELOW, P. V., BAXTER, G. D. M. Laser Photobiomodulation of Wound Healing in Diabetic and Non-Diabetic Mice: Effects in Splinted and Unsplinted Wounds. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 251–261, 2010.

DAVINI, R., *et al.* Estimulação Elétrica de Alta Voltagem: uma opção de tratamento. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, n. 3, p. 249-256, 2005.

ENWEMEKA C. S., *et al.* The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, n. 4 p. 323-329, p. 2004.

GONÇALVES R.V., *et al.* Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 350-355, 2010.

GOODSON, W. H, 3rd, HUNT T. K. Wound Healing and the diabetic patient. **Surg. Gynecol. Obstet.** v. 149, n.4, p. 600–608, 1979.

GÜNTER, C. I.; MACHENS H. G. New Strategies in Clinical Care of Skin Wound Healing. **Eur. Surg. Res.**, v. 49, n. 1, p. 16-23, 2012.

HENRIQUES, A. C. G, *et al.* Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

HOUGHTON, P. E., *et al.* Effect of Electrical Stimulation on Chronic Leg Ulcer Size and Appearance. **Physical Therapy**, v. 83, n. 1, p.17-28, January, 2003.

HUSSEIN, A. J., *et al.* Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. **North Am. J. Med. Sci.**, v. 3, n.4, p. 193-197, 2011.

JORGE, A. E. S. **Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica:** estudo comparativo de duas técnicas de aplicação. 2009. Tese (Mestrado) Programa de Pós Graduação Interunidades de Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, A. C., *et al.* Efeitos do Ultra-som Pulsado de Baixa Intensidade sobre a Cicatrização de Segunda Intenção de Lesões Cutâneas Totais em Ratos. **Acta Ortop. Bras.**, v. 14, n. 3, p. 152-157, 2006.

MENDONÇA, J. R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MESTER E, MESTER AF, MESTER A. The biomedical effects of laser applications. **Lasers Surg Med.**, v. 5, n. 1, p. 31–39, 1985.

MEYER, P. F, *et al.* Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v. 11, n. 6, p. 428-432, 2010.

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

OLSSON, D. C., *et al.* Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1199-1207, jul., 2008.

SILVEIRA, P. C. L., *et al.* Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. **Rev. Bras. Fisioter.**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 281-287, jul./ago., 2009.

TACON K. C. B. *et al.*, Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 373 – 378, 2011.

TARAMESHLOO M., *et al.* Aloe vera gel and thyroid hormone cream may improve wound healing in Wistar rats. **Anat. Cell. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 170-177, 2012.

TOYOKAWA, H., *et al.* Promotive Effects of Far-Infrared Ray on Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, n. 6, p. 724–729, 2003.

WOODRUFF L. D., *et al.* The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.