

## Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência

*Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser*

Jesus Antônio de Carvalho Abreu<sup>1</sup>, Aline da Luz Sousa<sup>2</sup>, Carmen Laís Gervásio Fônsaca Alves<sup>2,3</sup>, Jefferson Torres Nunes<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Médico especialista em Cirurgia Vascular. Professor da disciplina de Cirurgia Geral e preceptor do Internato em Cirurgia II da Faculdade Integral Diferencial, Teresina, Piauí.

<sup>2</sup> Acadêmicos do curso de Medicina da Faculdade Integral Diferencial, Teresina, Piauí.

<sup>3</sup> Pesquisadores do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Faculdade Integral Diferencial, Teresina, Piauí.

### RESUMO

**Objetivos:** verificar histologicamente a cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus* quando empregado o laser de baixa potência.

**Métodos:** foram utilizados 45 animais machos, distribuídos em três grupos conforme a terapêutica adotada (não tratados, tratados com laser na dose de 4 J/cm<sup>2</sup> e tratados com laser na dose de 8 J/cm<sup>2</sup>), os quais foram divididos em três subgrupos conforme o período de eutanásia (7, 14 e 21 dias). Foi removido um fragmento cutâneo de 2 cm de diâmetro do dorso de cada animal e a cada 24 horas foi irradiado laser nos fragmentos dos grupos tratados, com a dose estabelecida previamente.

**Resultados:** aos sete dias após o experimento, os grupos irradiados com laser de baixa potência apresentaram uma reepitelização mais eficiente quando comparados ao grupo não tratado. Além disso, os grupos tratados com laser apresentaram uma deposição de colágeno mais acentuada quando transcorridos 14 dias. A dose ajustada em 4 J/cm<sup>2</sup> foi mais efetiva.

**Conclusões:** o laser de baixa potência otimizou o processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus*. A dose ajustada em 4 J/cm<sup>2</sup> foi mais efetiva.

**DESCRIPTORIOS:** CICATRIZAÇÃO; PELE/lesões; PELE/anatomia & histologia; MODELOS ANIMAIS; EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL; TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE; RATOS.

### ABSTRACT

**Aims:** To assess histologically the healing of experimental skin wounds in *Rattus norvergicus* using low-power laser.

**Methods:** Forty-five males were divided into three groups according to the adopted therapy (untreated, treated with laser at a dose of 4 J/cm<sup>2</sup> and treated with laser at a dose of 8 J/cm<sup>2</sup>), which were divided into three subgroups according to time of euthanasia (7, 14 and 21 days). A fragment of 2 cm in diameter of skin was removed from the back of each animal, and laser was irradiated every 24 hours in the fragments of the treated groups, with the previously established dose.

**Results:** At seven days after the experiment, the low-power laser irradiated groups showed a more efficient reepithelialization when compared with the untreated group. Furthermore, the groups treated with laser showed a more marked deposition of collagen at 14 days. Dose adjusted in 4 J/cm<sup>2</sup> was more effective.

**Conclusions:** Low-power laser has enhanced the healing of experimental skin wounds in *Rattus norvergicus*. The adjusted dose in 4 J/cm<sup>2</sup> was more effective.

**KEY WORDS:** WOUND HEALING; SKIN/injuries; SKIN/anatomy & histology; MODELS, ANIMAL; ANIMAL EXPERIMENTATION; LASER THERAPY, LOW-LEVEL; RATS.

Recebido: janeiro de 2011; aceito: julho de 2011.

#### Endereço para correspondência/Corresponding Author:

JESUS ANTÔNIO DE CARVALHO ABREU  
Av. Rio Poty, 2381 – Horto Florestal  
CEP 64051-280, Teresina, PI, Brasil  
Tel.: (86)3216-7900  
E-mail: [jesus.a.c.abreu@hotmail.com](mailto:jesus.a.c.abreu@hotmail.com)

## INTRODUÇÃO

As tentativas do homem de intervir no processo de cicatrização de feridas remontam à Antiguidade, quando foi reconhecida a importância de protegê-las para evitar complicações. Os portadores de feridas desenvolvem sequelas com frequência, com consequências sociais intensas, podendo ocorrer perda de membros e funções, afastando a pessoa do trabalho e, por vezes, obrigando-a à aposentadoria precoce por invalidez.<sup>1</sup>

A cicatrização é um dos processos mais estudados atualmente. Pesquisas têm avaliado a importância de sua estimulação na reabilitação funcional e estética do paciente. A cicatrização pode ocorrer por primeira ou segunda intenção, com estágios inflamatório, fibroblástico e remodelador.<sup>2,3</sup> Ao longo do tempo, o homem sempre empregou artifícios com o intuito de otimizar o processo cicatricial através do uso de substâncias ou procedimentos.

O laser é uma radiação eletromagnética não ionizante, com características de monocromaticidade, coerência, direcionalidade e possibilidade de focalização em pequenas áreas.<sup>4,5</sup> É classificado em laser de alta intensidade (LAI) e laser de baixa intensidade (LBI). Entre os tipos mais utilizados para cicatrização estão o de HeNe (hélio-neônio), AsGa (arseneto de gálio) e AsGaAl (arseneto de gálio e alumínio).<sup>6,7</sup>

O laser é dividido também em alta e baixa potência. O primeiro é destinado à remoção, corte e coagulação de tecidos, enquanto que o laser de baixa potência (LBP) é utilizado em processos de reparação tecidual. Os principais efeitos gerados pelo LBP nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização.<sup>8</sup>

O LBP tem ação principalmente nas organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, lisossomas e membrana, gerando aumento de adenosina trifosfato (ATP) e modificando o transporte iônico. Acredita-se que existem fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Dessa forma o LBP acelera, em curto prazo, a síntese de ATP (glicólise e oxidação fosforilativa) e em longo prazo a transcrição e replicação do DNA.<sup>9</sup>

Vário pesquisador tem colaborado com dados concernentes à aplicação do LBP na cicatrização, porém a literatura ainda é bastante limitada e contraditória, principalmente por carência de detalhes na dosimetria, pois o comprimento de onda, a densidade de potência, o tempo de radiação e o estado de polarização da luz podem influenciar o efeito do laser na cicatrização.

Este trabalho teve por objetivo analisar a cicatrização de tecido epitelial do ponto de vista histológico após realização de tratamento com LBP de arsênio-gálio.

## MÉTODOS

A pesquisa foi realizada de acordo com as normas internacionais para pesquisa biomédica em animais (1990) e conforme a Lei Federal nº 6638, de maio de 1979. O protocolo de pesquisa foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Integral Diferencial, com protocolo de número 034/10. Os experimentos foram iniciados após aprovação pelo comitê.

Foi realizado um estudo experimental, *in vivo*, randomizado, com 45 indivíduos *Rattus norvegicus albinus*, cepa Wistar, idade de 150 dias, peso de 300 g, divididos em três grupos de 10 ratos, sendo que o grupo experimental 1 foi tratado com laser de arsênio-gálio, comprimento de onda de 904 nm, na dose de 4 J/cm<sup>2</sup> (grupo 4 J) e o grupo experimental 2 foi tratado com o mesmo laser, contudo a dose usada foi de 8 J/cm<sup>2</sup> (grupo 8 J). O terceiro grupo foi considerado grupo controle (grupo C) e não recebeu terapêutica. O tratamento com o laser foi iniciado no pós-operatório imediato e a cada 24 horas, até a eutanásia dos animais, sem a utilização de curativo sobre a lesão.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram previamente pesados e receberam, por via subcutânea, uma pré-anestesia com atropina na dose de 0,04 ml para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico.<sup>10</sup> Em seguida foram administradas drogas anestésicas por via intramuscular, o cloridrato de ketamina 10% (Syntec do Brasil, Cotia, SP), na dose de 0,1 ml para cada 100 g de peso corpóreo e o cloridrato de xilazina 2% (Syntec do Brasil, Cotia, SP), na dose de 0,1 ml para cada 100 g. Para cada animal foi utilizada uma seringa de insulina de 1 ml.<sup>11</sup>

A preparação cirúrgica da ferida foi realizada com a utilização de um *punch* metálico com lâmina cortante na sua borda inferior, o qual removeu um fragmento cutâneo com 2 cm de diâmetro do centro da área depilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal. Para terapia antimicrobiana no pós-cirúrgico, todos os animais receberam Pentabiótico (*Fort Dodge Saúde Animal*, São Paulo, SP) antibiótico de amplo espectro, via intramuscular profunda, em dose única de 0,02 ml para cada 100 g de peso corpóreo. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno (cinco animais por gaiola) com boas condições de higiene, alimentados com dieta padrão do biotério, ração Labina (*Purina*, Paulínia, SP) e água *ad libidum*.

Após períodos de 7, 14 e 21 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados em número de cinco por grupo, para a dissecação das amostras. Logo após a eutanásia, a peça cirúrgica foi constituída da lesão cutânea, com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal, sendo cada peça identificada isoladamente. Em seguida, as peças passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina, para estudo histomorfológico sob microscopia de luz. As lâminas foram numeradas de acordo com o número do animal e subgrupo ao qual pertencia.

A análise descritiva histológica baseou-se nos critérios de proliferação vascular, proliferação de fibroblastos, infiltrado inflamatório, tecido de granulação e reepitelização. Para tanto foram atribuídas três escores: 0 ausente, 1 moderada e 2 acentuada. Para a epitelização: 0 ausente, 1 parcial e 2 completa.<sup>9,10</sup>

Os dados obtidos no estudo foram analisados com auxílio do programa BioEstat 4.0. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

No sétimo dia de avaliação após o ato operatório houve diferença estatisticamente significativa entre o

grupo controle e os demais grupos, pois três animais do grupo irradiado com LBP 4 J/cm<sup>2</sup> e dois do grupo irradiado com LBP 8 J/cm<sup>2</sup> apresentavam uma epitelização parcial, enquanto que apenas um animal do grupo controle tinha epitelização parcial (Tabela 1).

Ao analisar a presença de neovasos, fibroblastos e colágeno no sétimo dia de pós operatório, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabelas 2, 3 e 4).

Observou-se que com 14 dias de evolução a presença de colágeno foi significativamente diferente entre o grupo controle e os demais grupos, já que todos os animais irradiados com LBP 4 J/cm<sup>2</sup> e quatro animais irradiados com LBP 8 J/cm<sup>2</sup> tinham presença acentuada de colágeno, enquanto que três animais do grupo controle tinham presença acentuada (Tabela 4). Nesse mesmo período de tempo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados quando analisadas a epitelização, a presença de neovasos e a presença de fibroblastos (Tabelas 1, 2 e 3).

Em 21 dias após o ato operatório não se evidenciou diferença significativa entre os grupos quando analisadas presença de epitelização, presença de neovasos, presença de fibroblastos e presença de colágeno (Tabelas 1 a 4).

**Tabela 1.** Escores da presença de epitelização na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus* segundo a utilização de laser de baixa potência

Epitelização (escores)	7 dias (número de animais)			14 dias (número de animais)			21 dias (número de animais)		
	4J	8J	C	4J	8J	C	4J	8J	C
0 (ausente)	2	3	4	0	0	2	0	0	1
1 (parcial)	3	2	1	0	1	2	0	0	3
2 (total)	0	0	0	5	4	1	5	5	1
Total de animais	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média dos escores	0,6	0,4	2	2	1,8	0,6	2	2	1
Valor de <i>p</i>		0,040			0,573			0,165	

4J: grupo experimental tratado com laser na dose de 4J/cm<sup>2</sup>; 8J: grupo experimental tratado com laser na dose de 8J/cm<sup>2</sup>; C: grupo controle (sem laser).

**Tabela 2.** Escores da presença de neovasos na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus* segundo a utilização de laser de baixa potência

Epitelização (escores)	7 dias (número de animais)			14 dias (número de animais)			21 dias (número de animais)		
	4J	8J	C	4J	8J	C	4J	8J	C
0 (ausente)	0	0	0	0	0	0	5	4	1
1 (moderada)	0	1	5	5	5	5	0	1	4
2 (acentuada)	5	4	0	0	0	0	0	0	0
Total de animais	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média dos escores	2	1,8	1	1	1	1	0,2	0,2	0,8
Valor de <i>p</i>		0,280			0,000			0,764	

4J: grupo experimental tratado com laser na dose de 4J/cm<sup>2</sup>; 8J: grupo experimental tratado com laser na dose de 8J/cm<sup>2</sup>; C: grupo controle (sem laser).

**Tabela 3.** Escores da presença de fibroblastos na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus* segundo a utilização de laser de baixa potência

Epitelização (escores)	7 dias (número de animais)			14 dias (número de animais)			21 dias (número de animais)		
	4J	8J	C	4J	8J	C	4J	8J	C
0 (ausente)	0	0	0	2	1	0	4	2	1
1 (moderada)	0	0	4	3	4	1	1	3	4
2 (acentuada)	5	5	5	0	0	4	0	0	0
Total de animais	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média dos escores	2	2	1,2	0,6	0,8	1,8	0,2	0,6	0,8
Valor de <i>p</i>	0,213			0,413			0,608		

4J: grupo experimental tratado com laser na dose de 4J/cm<sup>2</sup>; 8J: grupo experimental tratado com laser na dose de 8J/cm<sup>2</sup>; C: grupo controle (sem laser).

**Tabela 4.** Escores da presença de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em *Rattus norvergicus* segundo a utilização de laser de baixa potência

Epitelização (escores)	7 dias (número de animais)			14 dias (número de animais)			21 dias (número de animais)		
	4J	8J	C	4J	8J	C	4J	8J	C
0 (ausente)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 (moderada)	5	5	5	0	1	2	0	0	1
2 (acentuada)	0	0	0	5	4	3	0	0	1
Total de animais	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média dos escores	1	1	1	2	1,8	1,6	2	2	1,8
Valor de <i>p</i>	0,000			0,040			0,400		

4J: grupo experimental tratado com laser na dose de 4J/cm<sup>2</sup>; 8J: grupo experimental tratado com laser na dose de 8J/cm<sup>2</sup>; C: grupo controle (sem laser).

## DISCUSSÃO

As células epiteliais começam a proliferação poucos dias após a ocorrência da lesão, a partir das bordas da ferida ou de ilhas epiteliais (não lesadas) dentro da ferida, estimuladas por fatores de crescimento liberados, principalmente, pelos macrófagos. A proliferação das células epiteliais recebe influência direta da concentração de íons inorgânicos no tecido em cicatrização. A presença de níveis elevados de cálcio inibe a quimiotaxia e a adesão do queratinócitos à ferida.<sup>12</sup>

O processo de cicatrização tem um papel essencial na resposta protetora da lesão epidérmica por meio da reparação tecidual. Esse processo ativa mediadores inflamatórios, como citocinas e espécies reativas de oxigênio, que provocam efeitos nocivos sobre o tecido.<sup>13</sup> Acredita-se que o LBP possa interferir na síntese de citocinas e espécies reativas de oxigênio, diminuindo sua produção e acelerando assim o processo cicatricial: neste estudo, no sétimo dia após o procedimento cirúrgico os grupos irradiados com LBP apresentaram um processo de reepitelização mais eficiente quando comparados ao grupo que não foi tratado.

Alguns autores postulam que a laserterapia influencia parâmetros de estresse oxidativo, como alteração da atividade das enzimas antioxidantes e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A absorção da luz do laser acelera a transferência de elétrons (cadeia respiratória) e induz uma produção inicial de ERO, especificamente aumentando a produção de ânion superóxido. A produção em excesso dessas espécies pode acarretar danos nos constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Os danos no mecanismo celular como resultado da irradiação do laser e sua influência nos parâmetros oxidativos não estão bem compreendidos, havendo muitos resultados controversos.<sup>14</sup> Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a laserterapia possa alterar os mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO.

Os fibroblastos que migram para o interior da ferida a partir do tecido circundante são responsáveis pela produção do colágeno, proteína de grande importância na matriz extracelular. Os fibroblastos que derivam da ferida passam por alterações fenotípicas, influenciados principalmente pelas citocinas derivadas

dos macrófagos, caracterizando-se por maior síntese de colágeno e contração, porém com menor proliferação, em comparação com os fibroblastos dérmicos normais. Além dos fibroblastos, é possível encontrar na fase proliferativa as células endoteliais, responsáveis pela angiogênese, e os miofibroblastos, responsáveis pela aproximação das bordas da ferida (contração).<sup>15</sup> O laser pode ter interferido na deposição de colágeno, já que aos 14 dias do experimento os animais irradiados com LBP apresentaram uma maior concentração de colágeno.

Entre o oitavo e o 15º dia de cicatrização, os miofibroblastos apresentaram-se em número elevado, quando então, progressivamente regrediram, praticamente desaparecendo em torno do 30º dia. O mecanismo responsável por essa redução no número de células é a apoptose. Os três parâmetros essenciais que definem os miofibroblastos são a presença de fibras de estresse ( $\alpha$ -actina), os sítios de ligação estroma-célula bem desenvolvidos (fibronexus) e as junções gap e intercelulares bem definidas.<sup>11</sup>

Este estudo experimental possibilitou a análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais quando utilizado o laser de baixa potência como terapêutica. No tecido epitelial, os resultados favoráveis da estimulação pelo laser ocorreram até o término do tempo de cicatrização fisiológica, sendo que o laser ajustado em 4 J/cm<sup>3</sup> foi mais efetivo do que o ajustado em 8 J/cm<sup>3</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Blanes L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: [s.n.]; 2004. [23 p.]. [acesso 2010 jul 1]. Disponível em: <http://bapbaptista.com.br/feridasLeila.pdf>
2. Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, et al. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
3. Rocha JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. RBPS: Rev Bras Prom Saúde. 2004;17:44-8. [acesso 2011 jul 22]. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/408/40817209.pdf>
4. Almeida-Lopes L. Laserterapia na odontologia. *Biodonto-Clinica Odontologica Integrada* (Bauru). 2004;1:1-89. [acesso 2011 jul 22]. Disponível em: [http://www.nupen.com.br/Revista\\_port/laser\\_odonto.php](http://www.nupen.com.br/Revista_port/laser_odonto.php)
5. Garcia GV, Okamoto T, Kina RJ, et al. Reparação de feridas de extração dental submetidas ao tratamento com raio laser: estudo histológico em ratos. Rev Fac Odontol Lins. 1996;9:33-42.
6. Theodoro LH, Garcia VG. Lasers em implantodontia. J Bras Clin Odontol Int. 200;5(30):525-9.
7. Bourguignon Filho AM, Feitosa RCA, Beltrão GC, et al. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual: revisão de literatura. Rev Port Estomatol. 2005;46:37-43.
8. Almeida-Lopes L. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: Brugnara Jr A, Pinheiro ALB. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast; 1998. p.99-120.
9. Karu TI. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. IEEE J Quantum Electr. 1987;QE23:1703-17.
10. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir Bras. 2004;1:441-5. [acesso 2011 jul 22]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v19n4/a14v19n4.pdf>
11. Massone F. Anestesia veterinária: farmacologia e técnicas. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
12. Candido LC. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: Senac; 2001.
13. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. Injury. 2006;37(Suppl 1):s5-12.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology medicine. 2ª ed. New York: Oxford University Press; 2007.
15. Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.