

# O Efeito da Laserterapia na Reparação Tecidual em Ratos Estressados

## The Effect of Laser Treatment on Tissue Repair in Stressed Rats

Meire Heris Martinez Neves Ribeiro<sup>a</sup>; Alex Semenoff Segundo<sup>b\*</sup>; Tereza Aparecida Delle Vedove Semenoff<sup>c</sup>; Alvaro Henrique Borges<sup>b</sup>; Nayanne de Jesus Barbara<sup>b</sup>; Aurélio Rosa da Silva Junior<sup>d</sup>; Luiz Evaristo Ricci Volpato<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade de Cuiabá, Curso de Especialização em Odontopediatria, MT, Brasil

<sup>b</sup>Universidade de Cuiabá, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, MT, Brasil

<sup>c</sup>Universidade de Cuiabá, Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas, Odontologia e Biociências, MT, Brasil

<sup>d</sup>Centro Universitário de Várzea Grande, Especialização em Periodontia, MT, Brasil

\*E-mail: semenoff@uol.com.br

---

### Resumo

Foi objetivo deste estudo, verificar se há interferência do estresse na contração de feridas tratadas com laser de arseneto de gálio - alumínio (GaAlAs) em baixa intensidade. Foram utilizados 30 ratos machos da raça Wistar, divididos em 3 grupos: G1 - Grupo controle, G2 - Grupo de ratos submetidos à radiação vermelha e estressados e G3 - Grupo de ratos submetidos à radiação vermelha. Foi realizada uma ferida de 1cm<sup>2</sup> no dorso dos ratos e a aferição da contração da ferida foi feita nos dias 0, 3, 7 e 11. A aplicação do laser foi realizada imediatamente após a cirurgia, 24 e 48 horas no pós-operatório. Foram utilizados comprimento de onda vermelho visível (660nm) com potência de 40mW, 5J/cm<sup>2</sup>. O grupo G2 foi submetido a estresse - contenção física - por 12 horas diárias durante todo o experimento. Os resultados demonstraram que o grupo de ratos submetidos a estresse - G2 tiveram pior contração de ferida e o grupo submetido à radiação vermelha sem estresse - G3 apresentou melhor contração de ferida. Conclui-se que o estresse interfere negativamente na contração de feridas.

**Palavras-chave:** Estresse Fisiológico. Lasers. Cicatrização de Feridas.

### Abstract

*The aim of this study was to determine whether there is interference in the contraction stress of wounds treated with laser gallium - aluminum (GaAlAs) at low intensity. Thirty male Wistar rats were divided into 3 groups as follows: G1 - control group, G2 rats subjected to red radiation and stressed, and G3 - rats subjected to red radiation. A wound of 1 cm<sup>2</sup> was performed on the dorsum of mice, and the measurements of wound contraction were taken on days 0, 3, 7 and 11. The laser application was performed immediately after surgery, 24 and 48 hours postoperatively. Wavelength visible red (660 nm) with a power of 40mW, 5J/cm<sup>2</sup> were used. G2 was under stress - physical restraint - for 12 hours daily throughout the experiment. The results showed that the group of rats subjected to stress - G2 had worse wound contraction and the group undergoing red radiation and not stressed - G3 showed better wound contraction. It is concluded that stress impairs the contraction of wounds.*

**Keywords:** Physiological Stress. Lasers. Wound Healing.

---

### 1 Introdução

A reparação tecidual tem sido um dos processos mais estudados pelos pesquisadores na área da saúde nos últimos anos. Diferentes pesquisas têm avaliado a importância da estimulação do reparo tecidual na reabilitação bucal do paciente, tanto em seu aspecto funcional como estético (PETERSON *et al.*, 2005; ROCHA, 2004).

O reparo das feridas e sua reestruturação constituem um mecanismo complexo, em que vários fatores contribuem para o desenvolvimento de diversos tipos de cicatrização, podendo envolver a hipertrofia, atrofia ou normotrofia da área lesionada. Este processo compreende três fases: inflamação, granulação e formação de matriz extracelular. Desta forma, é um processo que envolve o fechamento e a epitelização da ferida cirúrgica, remodelação do tecido conjuntivo e a formação de cicatriz (SILVA, 2007).

O estresse psicológico pode interferir nas funções do sistema imunológico, pois diminui a concentração de citocinas, proteínas produzidas por células do sistema

imunológico que ajudam a combater as infecções, e aumenta os níveis de glicocorticóides. Basicamente, o estresse provoca a inativação do recrutamento ou inibe a função das células do sistema imunológico, necessárias ao combate da infecção (MARCONDES, 2006; MARUCHA; SHERIDAN; PADGETT, 2000), interferindo, também no reparo tecidual.

A laserterapia com o uso do laser de baixa intensidade envolve uma metodologia simples e que pode ser empregada como terapia adjuvante aos tratamentos convencionais ou como tratamento alternativo para algumas patologias. Os efeitos terapêuticos obtidos são: antiinflamatório, analgésico e de reparação tecidual (BRUGNERA, 2004; HENRIQUES *et al.*, 2008).

Uma vez que tais efeitos são desejados em praticamente todo tratamento odontológico, o laser tem sido utilizado em quase todas as especialidades odontológicas. O aumento substancial do interesse por essa terapia também tem sido notado em círculos científicos, devido ao significativo número de resultados satisfatórios com o laser (BRUGNERA, 2004; HENRIQUES *et al.*, 2008).

Apesar da relação entre o estresse e o reparo tecidual, assim como a relação do laser em baixa intensidade e o reparo tecidual, terem sido bastante pesquisadas nos últimos anos, (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ARRUDA; RODRIGUES; PARIZOTTO 2007; FERREIRA, 2006; LENHARO *et al.*, 2006; PALMA, 2006; SILVA, 2007; SILVA *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2009; VOLPATO, 2009), a inter-relação entre os dois fatores (estresse e laser) e seu reflexo no reparo tecidual ainda foram pouco estudados. Dessa forma, buscou-se avaliar se, a terapia com laser em baixa intensidade sob diferentes parâmetros e a sua interação com o estresse, provocam alguma alteração no reparo tecidual.

## 2 Material e Métodos

Inicialmente o projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral Universitário da Universidade de Cuiabá (UNIC), sob o número de protocolo CEP 2010/044 tendo recebido parecer favorável à sua execução.

Para o experimento foram selecionados trinta ratos da espécie *Rattus Novergicus* da linhagem Wistar, obtidos junto ao Biotério Central da UNIC, com peso inicial médio de 324,52 gramas. Antes do início dos experimentos, os ratos passaram por um período de adaptação ao novo ambiente durante uma semana. Os animais foram mantidos em caixas-moradia (polietileno 16x40x30) em número de dez, com ração padronizada e água *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada a 23 °C e umidade aproximada de 40%. Os animais foram divididos de forma aleatória (por um indivíduo não pertencente ao estudo) em três grupos de igual número da seguinte forma: Grupo Controle (GC) - ratos não submetidos a estresse e a fototerapia; Grupo de Intervenção I (GEV)- ratos submetidos a estresse e fototerapia com laser vermelho; Grupo de Intervenção II (GV) - ratos não submetidos a estresse e submetidos a fototerapia com laser vermelho.

No primeiro dia foram confeccionadas as feridas no dorso de cada rato sob anestesia geral, através de administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de xylazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), para cada 100 gramas de peso do animal. Após a anestesia dos animais, a região lateral direita da linha média dorsal do animal foi preparada, realizando-se a tricotomia com auxílio de tesoura e aparelho barbeador descartável e desinfecção (clorexidina a 2%). Antes da incisão, as bordas das feridas foram demarcadas utilizando-se caneta hidrográfica e moldes de 1cm<sup>2</sup> confeccionados previamente em cartolina. Em ato contínuo foram conferidas as mensurações utilizando-se um paquímetro digital. As feridas foram promovidas com bisturi e tesoura íris, retirando-se pele, tecido subcutâneo e gordura, preservando-se a integridade do tecido muscular subjacente.

A indução do estresse foi feita pela imobilização física dos

ratos pertencentes ao GEV durante os onze dias do ensaio. A imobilização foi induzida pelo acondicionamento dos animais em tubos de PVC, compatíveis com seu tamanho e, com a passagem de ambos os lados interrompidos com arame, de forma a possibilitar a respiração dos animais (Figura 1).

**Figura 1:** Ratos acondicionados em tubo de PVC.



Esse procedimento teve duração de 12 horas diárias entre o período das 06h às 18h, a uma temperatura média de 26 °C.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico foi realizada a primeira sessão de laserterapia na ferida experimental no dorso dos ratos pertencentes aos grupos de intervenção. Nos dois dias subsequentes, foram realizadas sessões de fototerapia utilizando sempre os mesmos parâmetros.

O equipamento utilizado para a fototerapia foi um aparelho de laser de baixa intensidade de alumínio gálio índio fósforo – AlGaInP (Twinflex II - MMOptics Ltda - São Carlos, SP, Brasil), com uma ponteira de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660nm) com potência de 40mW e 5 J/cm<sup>2</sup>

A aplicação foi realizada ao longo da ferida cirúrgica e de forma pontual, (LIZARELLI, 2007) (Figura 2). Por ser tratar de uma lesão quadrada o laser foi irradiado em cinco pontos: um ponto central e um ponto em cada extremidade. Seguindo o protocolo de Lizarelli realizou-se sessão imediata e nos pós-operatórios cirúrgicos de 24 e 48h. O tempo de aplicação foi de 10 segundos por ponto para o laser vermelho.

**Figura 2:** Aplicação do laser vermelho



As feridas experimentais no dorso dos animais de todos os grupos foram mensuradas no dia em que foram executadas e após três, sete e onze dias, com o auxílio de paquímetro digital.

A partir das medidas das bordas da ferida, padronizada na face lateral direita e borda inferior, obteve-se o valor de sua área, sendo avaliada a contração da ferida por meio da seguinte fórmula (AGREN; MERTZ; FRANZÉN, 1997):

$$\frac{(\text{área inicial} - \text{área do dia da medida})}{\text{área final}} \times 100 = \text{percentual da contração no dia da medida}$$

As medidas foram tomadas sempre pelo mesmo avaliador com os animais em estado de alerta, contidos manualmente por um

auxiliar, enquanto o avaliador, cego para os grupos experimentais, realizava a mensuração com o paquímetro digital (Figura 3).

**Figura 3:** Mensuração da ferida com paquímetro digital.



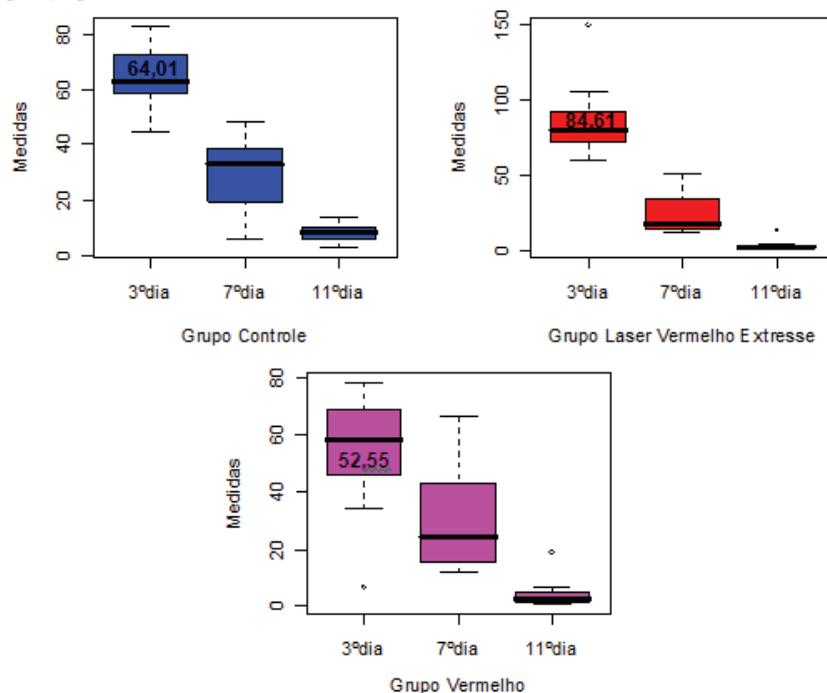
Aos resultados encontrados foi dado tratamento estatístico utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) segundo um experimento fatorial, no qual foram considerados como fatores o dia e o grupo, sendo que as variáveis que não apresentaram comportamento paramétrico foram transformadas. Em seguida foi utilizado o teste de Tukey para comparação entre os diferentes dias e grupos. As diferenças foram consideradas

significativas quando  $p$ -valor  $< 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o software livre R (2010).

### 3 Resultados e Discussão

As medidas das feridas cirúrgicas dos animais são apresentadas na Figura 4 de acordo com o grupo e o dia da aferição.

**Figura 4:** Box Plots referentes às medidas (em milímetros) em cada dia de aferição, por grupo de intervenção.



Como nota-se o G2 teve maior valor para a contração de ferida no dia 3. Sendo que para os dias 7 e 11 não se observou diferenças estatísticas significativas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Tabela referente à contração de feridas nos diferentes tempos experimentais

Dias	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F Valor	P Valor
D3	3	18.498432	6.166144	7.47	0.0001
D7	3	1.601948	0.533983	0.65	0.5867
D11	3	1.157723	0.385908	0.47	0.7056

Diferença estatística na área de contração de ferida para o dia 3

Como a análise de variância demonstrou que existe interação entre os fatores grupo e dia ( $p < 0,05$ ), os fatores foram analisados conjuntamente.

A Tabela 2 mostra a diferença estatística significativa dentro de cada grupo para os dias da reparação tecidual ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2:** Tabela referente à contração de feridas nos diferentes grupos experimentais

Grupos	Grau de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F Valor	P Valor
G1	2	76.187913	38.093956	46.15	<.0001
G2	2	137.619837	68.809919	83.36	<.0001
G3	2	55.337795	27.668897	33.52	<.0001

Diferença estatística significativa dentro de cada grupo para contração das feridas ( $p < 0,05$ )

No presente estudo, observou-se que houve diferença estatística em relação à aplicação do laser somente para o dia 3. Quando os grupos experimentais (lasers) foram comparados com o grupo controle não se observou nenhuma diferença estatística.

Damante, Marques e Micheli (2004) propuseram uma revisão de literatura, na qual avaliaram clinicamente os efeitos do laser diodo de AsGaAl na cicatrização de gengivoplastias. No estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ao comparar as amostras submetidas à irradiação com aquelas não irradiadas no pós-cirúrgico. Para esses autores, o resultado obtido no estudo sugere que o laser não acelerou a cicatrização da mucosa oral submetida à cirurgia periodontal.

O parâmetro do laser em baixa intensidade utilizado neste estudo foi adotado segundo especificações propostas por Lizarelli (2005), cuja recomendação para a irradiação do laser vermelho de espectro visível (40mW, 660nm, 5 J/cm<sup>2</sup>, 10s) é realizado por pontos da ferida cirúrgica, logo após a sessão operatória e mais duas sessões de 24 e 48 horas.

Amorim *et al.* (2006) com o auxílio do laser de comprimento de onda de 685 nm, promoveu aceleração da

cicatrização em pacientes submetidos à gengivectomia.

Volpato (2009) comparou a ação do laser em baixa intensidade (660nm) e do LED sob parâmetro similar (637 ± 15nm) na redução de incidência da mucosite bucal em crianças sob o tratamento quimioterápico. O autor concluiu que não houve diferença estatística entre os resultados encontrados com o uso dos dois aparelhos, havendo uma redução na incidência, na dor e na severidade da mucosite bucal para ambos os grupos.

Lenharo *et al.* (2006) realizaram um estudo de revisão de literatura levantando dados que abordassem o comportamento do laser de baixa intensidade frente a periodontia e a reparação tecidual. Concluiu que para a reparação o laser atua como facilitador e como coadjuvante para a redução bacteriana associada a corantes fotossensíveis.

Costardi *et al.* (2008), em seu estudo do efeito do LBI 670 nm em contusão muscular em ratos, observaram que ocorreu uma melhora qualitativa dos músculos irradiados.

Diante do exposto a maioria dos estudos diz que a terapia com laser em baixa intensidade teve papel relevante na reparação de feridas. E, também, nestes trabalhos relacionados, à aplicação do laser ocorreu em todos os dias do experimento. Neste presente estudo a aplicação somente foi realizada até o 3 dia, pois seguimos o protocolo de Lizarelli. Levando-nos a suspeitar que se as aplicações fossem realizadas também nos dias 7 e 11 poderia levar a uma melhora na contração de feridas nestes tempos experimentais.

Sabe-se que períodos prolongados de estresse acarretam imunossupressão da produção de citocinas por células localizadas no baço e no timo, importantes centro de maturação e proliferação de células do sistema imune (MOREIRA, 2006). Levando ônus ao organismo que parece estar relacionado a alterações na secreção de cortisol e aos efeitos deste hormônio em estruturas relacionadas ao processamento da memória. Com isso, o estresse pode direcionar e modular a resposta do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), sendo capaz de interferir nas intercomunicações dos sistemas, suprimindo o sistema de defesa, estabelecendo-se a doença (MOREIRA, 2006; PALMA, 2006).

Os resultados deste estudo evidenciaram o efeito do estresse crônico sob o GEV, acarretando, assim, em uma demora na reparação tecidual, mesmo com o auxílio do laser de comprimento de onda de 660nm.

#### 4 Conclusão

A partir da análise dos resultados conclui-se que houve diferença estatística entre os grupos 2 e 3 para o 3º dia e que o estresse impactou negativamente na ação da laserterapia.

#### Referências

- AGREN, M.S.; MERTZ, P.M.; FRANZÉN, L. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.36, p.53-58, 1997.
- AMORIM, J.C. *et al.* Clinical study of the gingiva healing after

- gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.*, v.24, n.5, p.588-594, 2006.
- ANDRADE, A.G.; LIMA, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. *Rev Bras Queimaduras*, v.9, p.21-30, 2010.
- ARRUDA, E.R.B.; RODRIGUES, N.C.; PARIZOTTO, T.C.E. Na influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev. Bras. Fisioter.*, v.11, n.4, p.283-288, 2007.
- BRUGNERA, A. Biomodulatory effect of lasertherapy: clinical indications in detistry. *Brazilian Dental Journal*, v.15, p.60, 2004.
- COSTARDI, C.H.Z. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (670 nm) após contusão muscular em ratos. *Fisioter. Mov.*, v.21, n.2, p.21-30, 2008.
- DAMANTE, C.A.; MARQUES, M.; MICHELE, G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura. *RFO*, v.13, n.3, p.88-93, 2008.
- FERREIRA, M.A. *Efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização em ratos jovens e idosos: estudo morfométrico e morfológico*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - UNIFENAS, 2006.
- HENRIQUES, A.C.G. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. *Odontologia. Clín.- Científ.*, v.7, n.3, 197-200, 2008.
- LENHARO, C.P. et al. Atuação dos lasers terapêuticos em periodontia. Revisão de literatura. *Rev de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo*, v.18, n.3, p.281-286, 2006.
- LIZARELLI, R.F.Z. *Protocolos clínicos odontológicos: uso do laser de baixa intensidade*. São Carlos: Gorham Design, 2007.
- MARCONDES, F.K. *Avaliação da relação entre estresse/ ansiedade e cicatrização de úlceras diabéticas estimulada por eletroterapia*. Projeto Fapesp. Piracicaba, 2006.
- MARUCHA, P.T.; SHERIDAN, J.F.; PADGETT, D. *Stress and wound healing. Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic, 2000.
- MOREIRA, P.R.S. *Efeitos do estresse crônico na linfoproliferação e na produção in vitro de IFN-gama e IL-10 por células do Baco e do timo de ratos hipotireoideanos*. Dissertação (Mestrado em Imunologia) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
- PALMA, K.A.X.A. *Efeitos do envelhecimento e do estresse crônico sobre a memória declarativa*. Tese (Doutorado em Gerontologia Biomédica) - Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, 2006.
- PETERSON, L.J. et al. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *RBPS*, v.17, n.1, p.44-48, 2004.
- SILVA, T.C. *Estudo in vivo dos efeitos biomoduladores de um laser em baixa intensidade no fator de crescimento endotelial vascular*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade e São Paulo, 2007.
- SILVA, E.M. et al. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *RSBO*, v.4, n.2, p.29-35, 2007.
- SILVEIRA, P.C.L. et al. Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. *Rev. Bras. Fisioter.*, v.13, n.4, p.281-287, 2009.
- VOLPATO, L.E.R. *Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do Light-Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças em tratamento quimioterápico*. Tese (Doutorado em Odontologia) – Univeridade de São Paulo, 2009.

