

## EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM O LASER HENE 632.8NM SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS

Delcídes Gomes do Nascimento \*  
Carlos Alexandre Molena-Fernandes \*\*  
Juliano Luiz Sartoretto \*\*\*  
Luiz Carlos Bruschi \*\*\*\*  
Roberto Kenji Nakamura Cuman \*\*\*\*\*  
Francisco Pereira da Silva \*\*\*\*\*

---

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de *laser* HeNe 632.8nm sobre o conteúdo de fibroblastos e sua influência no processo cicatrizacional de feridas em ratos. Os animais, após incisão intencional, foram submetidos a irradiação com *laser* HeNe 632.8nm (4J/cm<sup>2</sup>, única e diária) por períodos de 1,2,3,4,5,7,9,11,15,21 e 29 dias. A avaliação histológica e a contagem de fibroblastos foram realizadas através do programa de captura de imagem *Image Pro Plus 5*. A irradiação com o *laser* HeNe 632.8nm promoveu uma redução no conteúdo de fibroblastos na área da ferida irradiada, sugerindo um aumento da síntese de colágeno e na diferenciação de fibroblastos. Os dados indicaram que a irradiação pelo *laser* HeNe 632.8nm interfere no processo de cicatrização de feridas.

**Palavras-chave:** Laserterapia. Cicatrização de feridas. *Laser* HeNe 632.8nm. Fibroblastos.

---

### INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo e envolve três fases: a) a inflamatória, quando ocorre a migração celular de leucócitos e plaquetas; b) a proliferativa, com aumento de fibroblastos e mastócitos; e c) a de remodelação, quando os fibroblastos participam do processo de reestruturação da matriz extracelular e do depósito de colágeno. Entretanto, a dificuldade no processo cicatricial ocorre principalmente nos estágios iniciais do processo de reparo, onde se observa uma acentuação do edema, uma diminuída proliferação vascular e uma redução significativa de elementos celulares tais como

leucócitos, macrófagos e fibroblastos (CARVALHO et al., 2006).

A palavra *laser* é a sigla de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, amplificação da luz por meio da estimulação da emissão da radiação. A *Low Level Light Therapy* (LLLT) ou terapia de baixa intensidade de luz é uma forma de fototerapia que envolve o uso de *laser* de baixa potência, monocromático e de coerente feixe de luz, com efeitos de fotobioestimulação e não-termais, utilizado para terapêutica na analgesia e como estimulante do biotrofismo (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

A ação do *laser* é devida a efeitos fotoquímicos da luz que provocam

---

\* Fisioterapeuta, Mestre em Medicina, Professor do curso de Fisioterapia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

\*\* Educador Físico. Doutorando em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

\*\*\* Farmacêutico, Doutor em Ciências: Farmacologia, Pesquisador na Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, Estados Unidos.

\*\*\*\* Doutor em Ciências, Professor do Departamento de Histologia da UEL.

\*\*\*\*\* Farmacêutico, Doutor em Ciências: Farmacologia, Professor do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM.

\*\*\*\*\* Médico, Doutor em Medicina, Professor do Departamento de Clínica Médica e Cirúrgica da UEL.

fotobioestimulação. O comprimento de onda do *laser* é crítico na absorção do *laser* pelos tecidos e nos efeitos fisiológicos produzidos. Os comprimentos mais utilizados em terapia são os compreendidos entre as faixas de 632.8nm a 904nm do espectro da luz. A profundidade de penetração varia de 2mm para *laser* na faixa visível de comprimento de onda a 5mm para o *laser* infravermelho. Como a penetração nos tecidos se processa de forma exponencial, para se conseguirem efeitos fisiológicos significativos e efeitos terapêuticos, a potência e dosagem correta é alvo de discussão constante (SCHINDL et al., 2000).

Na cicatrização dos tecidos, as evidências que relacionam o comprimento de onda da radiação com os efeitos biológicos específicos são extensas, envolvendo experimentos teciduais e celulares em laboratório. O *laser* visível de 632.8nm de comprimento parece ser o mais efetivo para a cicatrização de feridas e o de 780nm é o favorito para regeneração, enquanto os de 830nm e 904nm são usados para dores musculares (MESTER; MESTER; MESTER, 1985). Diferentes efeitos biológicos foram observados após irradiação com LLLT, entre eles a estimulação da proliferação celular, especialmente em fibroblastos e na síntese do colágeno (ABERGEL; LYONS; CASTEL, 1987).

Posten et al. (2005), em artigo de revisão de literatura, demonstraram diversos aspectos da utilização clínica e experimental do *laser* de baixa intensidade. Entretanto, os benefícios da terapia com *laser* na cicatrização de feridas ainda são controversos, já que, metodologicamente, são utilizados diferentes tipos de *laser*, com diferentes comprimentos de onda, potência do *laser* e dosagens, o que pode explicar achados contraditórios. Por outro lado, o tratamento com *laser* tem sido recomendado para feridas indolores e úlceras tróficas para promover uma cicatrização mais rápida, sendo que a radiação visível de baixa intensidade tem efeito na aceleração ou estimulação da proliferação celular. Foi observado também que qualquer efeito fisioterápico pode ser muito menos evidente, ou não existir, caso a ferida já esteja cicatrizando de forma ideal (LOWE; WALKER; O'BYRNE, 1998).

Trabalhos têm demonstrado a aceleração do processo de cicatrização pelo tratamento

com *laser* HeNe 632.8nm, porém o mecanismo de ação do *laser* ainda não está esclarecido. O comprimento de onda do *laser* HeNe é de 632,8 nm, sendo ele muito utilizado na reparação tecidual. Em baixa intensidade, este *laser* não é cirúrgico, tampouco apresenta potencial destrutivo; apresenta características fotoestimulantes seletivas, atingindo somente as estruturas superficiais, e é melhor absorvido pelos tecidos vermelhos (MESTER; MESTER; MESTER, 1985). As ondas de 660, 820 e 870nm estimulam os macrófagos a produzir fatores que levam à liberação de fibroblastos acima dos níveis de controle, enquanto a de 880nm causa inibição. Pelo importante papel dos fibroblastos no processo cicatricial, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os efeitos do *laser* de baixa intensidade sobre estas células, principalmente sobre processos de crescimento celular, locomoção e produção de colágeno que envolvem a cicatrização de feridas. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da aplicação do *laser* HeNe 632.8nm sobre fibroblastos e na aceleração do processo de reparo de lesões intencionais em ratos saudáveis.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo experimental, foram utilizados 40 ratos machos adultos com idade de 6 meses, albinos, da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*, variedade *Albinus*, *rodentia mammalia*), provenientes do Biotério do Laboratório de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Os animais foram distribuídos em 10 grupos de quatro indivíduos, segundo os períodos de tratamento pela irradiação com *laser* HeNe 632.8nm.

Os animais foram colocados em gaiolas de aço forradas com cepilho, 24 horas antes do início do experimento. A alimentação foi composta de ração comercial padronizada Nuvital®, que segue as recomendações do *National Research Council e National Institute of Health-USA*, para camundongos e ratos de laboratório. Não houve restrições de acesso à ração ou à água. No início do experimento, os animais foram pesados em

balança de precisão, oscilando seu peso entre 250 e 350 gramas.

Estabeleceu-se que, após o início do experimento, se houvesse morte de algum animal, este não seria substituído, e seria realizada a necropsia para estabelecer a *causa mortis*.

### Ato operatório

Os animais foram anestesiados com a inalação de éter etílico, em caixa de polietileno. Na seqüência, foi realizada a tricotomia bilateral, na região do dorso, com máquina elétrica.

Foram realizadas duas incisões longitudinais da extensão de 3cm com bisturi BD® n°15, atingindo a pele e o tecido subcutâneo, em cada lado do dorso. Em seguida realizou-se a sutura da ferida, com três pontos simples, utilizando-se fio monofilamentar de poliamida 5-0.

As feridas foram irradiadas com aparelho de *laser* HeNe, de potência contínua (CW) de 3mw (fabricação nacional, previamente calibrado no Laboratório de Física da UEL), com diâmetro do feixe de 1,08mm, divergência de 0,54 MRA, comprimento de onda de 632,8nm e perda óptica na fibra da ordem de 30% .

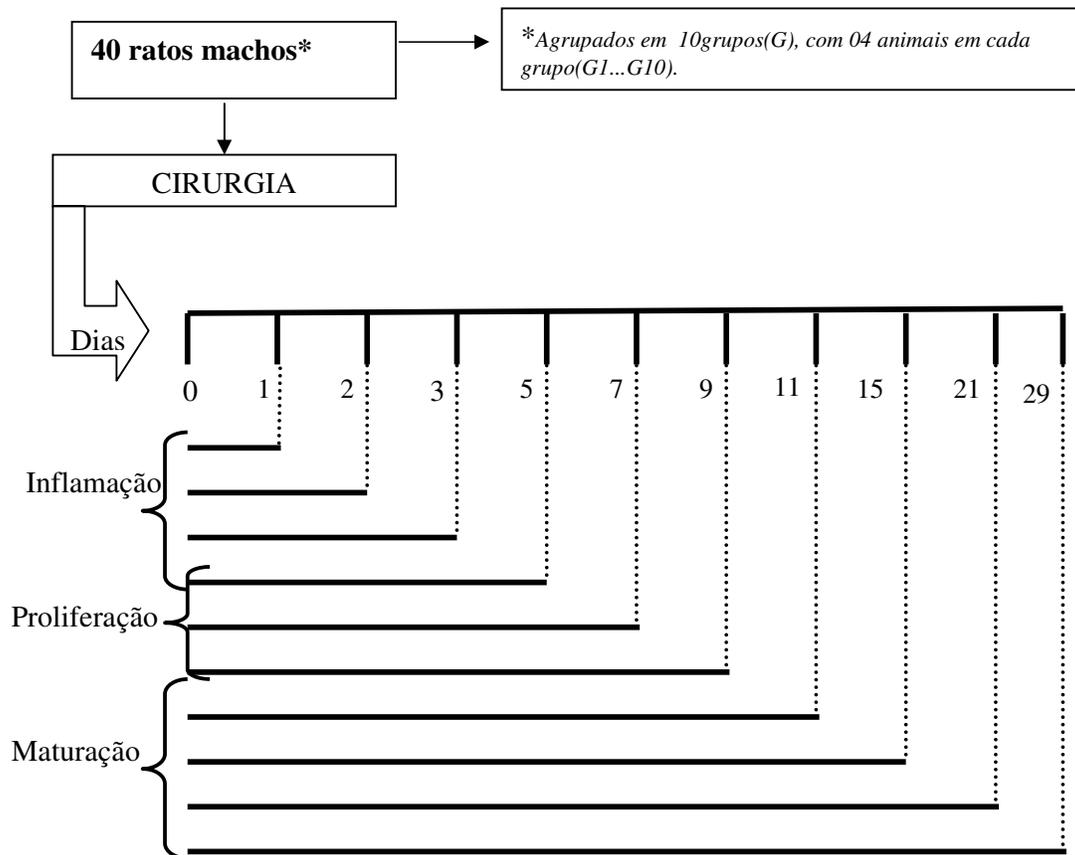
A lesão foi irradiada com 4J/cm<sup>2</sup> de forma pontual, com a caneta *laser* a aproximadamente 0,5cm de distância da incisão, com o feixe perpendicular a cada 1cm da extensão da incisão, com 35s de exposição, estando a incisão homóloga protegida com tecido de algodão, não refletivo, de cor verde (MEDRADO et al., 2003).

As irradiações nas feridas começaram imediatamente após a sutura (dia 0) e foram realizadas diariamente com intervalo de vinte e quatro horas durante o experimento. Os animais do grupo 1 receberam tratamento uma única vez e sofreram eutanásia vinte e quatro horas depois. Nos outros grupos, os animais sofreram eutanásia vinte e quatro horas após o tratamento: os do grupo 2, após 2 dias de tratamento; os do grupo 3, após 3 dias de tratamento; os do grupo 4, após 5 dias de tratamento; os do grupo 5, após 7 dias de tratamento; os do grupo 6, após 9 dias de tratamento; os do grupo 7, após 11 dias de tratamento; os do grupo 8, após 15 dias de tratamento; os do grupo 9, após 21 dias de tratamento e os do grupo 10, após 29 dias.

Os animais foram observados, diariamente, quanto ao seu estado geral de saúde, alimentação, aspecto dos pêlos, ocorrência de lesões no local da incisão e atividade na gaiola, até a data do sacrifício. Todos os animais sofreram eutanásia por meio de asfixia, resultado do aumento da quantidade do anestésico na caixa de polietileno.

Foram retirados fragmentos retangulares de pele das áreas irradiada e não irradiada (controle), circundando no mínimo um centímetro de pele a partir das margens das incisões. Os fragmentos foram fixados em quatro pontos sobre fragmentos retangulares de cartolina branca. Na seqüência foram acondicionados em solução de bouin e conservados em geladeira por 8hs. As lâminas histológicas foram preparadas e coradas com corante hematoxilina-eosina. A avaliação histológica e a contagem de fibroblastos foram realizadas através do programa de captura de imagens *Image Pro Plus 5*.

### Fluxograma do experimento



A cirurgia ocorreu no dia zero (0), e a seguir, a cada vinte e quatro horas, houve a irradiação pelo *laser* HeNe 632.8nm com potência de 4 joules durante 35 segundos a cada 1cm da lesão.

Nesta análise de variância, verificou-se a existência de diferença significativa entre os grupos e as áreas, e nos dois casos o nível de significância foi inferior a 1%; porém não se detectou uma diferença significativa na interação grupos x áreas, o que leva a concluir que os lados irradiados e controle se comportam igualmente dentro dos grupos.

Os resultados foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Tukey.  $P < 0,05$  foi utilizado como nível de significância.

Quanto às áreas, por serem somente duas (irradiada e controle), já se chega à conclusão da diferença significativa entre eles pela análise de variância, independente do grupo, ou seja, é verificado o mesmo comportamento entre os lados dentro de todos os grupos.

Tabela 1- Comparação da contagem de fibroblastos pela área total entre os grupos.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
Médias	7844,7	8095,1	5907,5	3501,3	6490,7	3316	6528,9	3578	7147,6	2899,8
G1		NS	*	*	NS	*	NS	*	NS	*
G2			*	*	*	*	*	*	NS	*
G3				*	NS	*	NS	*	NS	*
G4					*	NS	*	NS	*	NS
G5						*	NS	*	NS	*
G6		Inflamação					*	NS	*	NS
G7								*	NS	*
G8									*	NS
G9										
G10										

\* diferença significativa entre os grupos

## DISCUSSÃO

Vários trabalhos da literatura têm demonstrado resultados controversos sobre a utilização de *laser* no processo de cicatrização de feridas (POSTEN et al., 2005). Neste sentido, Pugliese et al. (2003) estudaram os efeitos da radiação por *laser* nas primeiras 72 horas em relação às fibras elásticas e colágeno em ratos, e observaram que os animais irradiados tiveram uma redução no edema e no infiltrado inflamatório. Concluíram que a terapia por *laser* de baixa potência contribui para o aumento na quantidade de colágeno e fibras elásticas na fase inicial do processo de cicatrização.

Hallman et al. (1988), em estudo realizado *in vitro* com fibroblastos humanos irradiados com *laser* HeNe 632.8nm nas diferentes fases de maturação, não observaram nenhum efeito significativo da radiação *laser* sobre a proliferação celular, seja estimulante seja inibitório. Estudos realizados por Colver e Priestley (1989) com a utilização do *laser* HeNe também observaram resultados negativos quando analisaram os efeitos proliferativos, a síntese de colágeno e a síntese de glicosaminoglicanas em fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Estes dados poderiam sugerir que o *laser* não estaria interferindo na fase proliferativa da cicatrização. Não obstante, em nosso estudo, ao se comparar a quantidade de fibroblastos entre as áreas irradiadas e controle, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa, demonstrando que o processo de cicatrização foi acelerado na área irradiada

pelo *laser* HeNe 632.8nm, resultados que corroboram o observado por Kana et al. (1981) e Bisht, Gupta e Misra (1994). Além disso, nossos resultados indicaram uma redução do número de fibroblastos nas áreas submetidas à radiação, sugerindo que houve um aumento na síntese do colágeno e na da diferenciação de fibroblastos. Entretanto, este fato não foi observado por Allendorf, Bessler e Huang (1997), que, ao estudarem o mecanismo da bioestimulação pelo *laser* HeNe na cicatrização de feridas em ratos, concluíram que a irradiação pelo *laser* HeNe não produziu nenhum benefício mensurável na cicatrização de feridas.

Diversos estudos experimentais foram realizados em animais saudáveis, no entanto alguns estudos foram realizados em animais portadores de diabetes, patologia que interfere significativamente no processo de cicatrização. Reddy (2003) examinou a hipótese da fotobioestimulação pelo *laser* induzir à aceleração da cicatrização de feridas em ratos diabéticos e concluiu que a fotobioestimulação acelerou a produção de colágeno e promoveu uma estabilização de todo o tecido conjuntivo na cicatrização de feridas de ratos diabéticos. Neste sentido, Carvalho et al. (2006) demonstraram que a aplicação do *laser* HeNe de baixa intensidade (632,8 nm) promovia um aumento na porcentagem de colágeno em feridas de pele de ratos diabéticos através do aumento da quantidade de fibras de colágeno, processo semelhante ao observado em animais não diabéticos. Estes dados indicaram eficácia da aplicação do *laser* no processo de cicatrização no diabetes experimental.

Apesar de alguns estudos em células reportarem um aumento na proliferação de diferentes tipos de células, tais como: fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, o mecanismo pelo qual o *laser* de baixa intensidade exerce esses efeitos ainda não está esclarecido. Além disso, a influência do laser sobre as diferentes fases da cicatrização deve ser mais bem estudada. Não obstante, pesquisas que objetivam elucidar os mecanismos fotoquímicos pelos quais este *laser* age sobre a expressão de fatores de crescimento e diferenciação celular, além de

mediadores envolvidos no processo, estariam justificando a utilização terapêutica desta tecnologia no processo de cicatrização de feridas.

## CONCLUSÃO

A aplicação do *laser* HeNe 632.8nm promove melhoria no processo de cicatrização de feridas intencionais em ratos, provavelmente por promover uma maior diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos na área irradiada, acelerando o processo cicatricial.

## EFFECTS OF HENE 632.8NM LASER APPLICATION ON WOUND HEALING IN RATS

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of HeNe 632.8nm laser on fibroblast content and its influence on the wound healing process in rats. After a deliberate incision, the animals were subjected to irradiation with HeNe laser 632.8nm (4J/cm<sup>2</sup>, once a day) for periods of 1,2,3,4,5,7,9,11,15,21 and 29 days. The histological analysis and fibroblasts count were analyzed using *Image Pro Plus 5* imaging software. HeNe laser irradiation promoted a decrease in the fibroblast content in the irradiated wound area, suggesting an increase in collagen synthesis and fibroblasts differentiation. The data indicated that irradiation with HeNe 632.8nm interferes in the wound healing process.

**Key words:** Laser Therapy. Wound healing. HeNe 532.8nm laser. Fibroblasts.

## LOS EFECTOS DE LA APLICACIÓN DEL LASER HENE 632.8NM SOBRE HERIDAS EN RATONES

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue investigar los efectos de HeNe 632.8nm láser sobre el contenido de fibroblastos y su influencia en el proceso de cicatrización de heridas en ratones. Los animales tras incisión intencional han sido sometidos a irradiación con laser HeNe 632.8nm (4J/cm<sup>2</sup>, una vez por día) por períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 15,21 y 29 días. La evaluación histológica y el número de los fibroblastos fueron analizadas por un programa de captura de imagen *Image Pro Plus 5*. La irradiación con *láser* HeNe 632.8nm promovió una disminución en el número de los fibroblastos en el área de la herida, lo que sugiere un aumento en el proceso de síntesis de colágeno y de la diferenciación de fibroblastos. Los datos indicaron que la irradiación por el láser HeNe interfirió en el proceso de cicatrización de la herida.

**Palabras Clave:** Láserterapia. Heridas. HeNe 632.8nm. Fibroblastos.

## REFERÊNCIAS

- ABERGEL, R. P.; LYONS, R. F.; CASTEL, J. C. Bioestimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, New York, v. 13, n<sup>o</sup>. 8, p. 127-133, May 1987.
- ALLENDORF, J. D.; BESSLER M.; HUANG, J. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1,2, and 4J/cm<sup>2</sup> failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate tensile strength. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 20, n<sup>o</sup>. 4, p. 340-345, Oct. 1997.
- BISHT, D.; GUPTA, S. C.; MISRA, V. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 100, n<sup>o</sup>. 2, p. 43-46, Aug. 1994.
- CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 3, p.177-183, jul. 2006.
- COLVER, G. B.; PRIESTELEY, G. C. Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing "*in vitro*". **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 121, n<sup>o</sup>. 2, p. 179-186, Aug. 1989.
- HALLMAN, H. O.; BASFORD, J. R.; O'BRIEN, J. F.; CUMMINS, L. A. Does low-energy Helium-Neon irradiation after in vitro replication of human fibroblasts? **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 8, n<sup>o</sup>. 2, p. 125-129, Feb. 1988.
- KANA, J. S.; HUTSCHENREITER, G.; HAINA, D.; WAIDELICH, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 116, n<sup>o</sup>. 3, p. 293-296, July 1981.

- LOWE, A. S.; WALKER, M. D.; O'BYRNE, M. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 23, n°. 7, p. 291-298, Apr. 1998.
- MEDRADO, A. R.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 32, n°. 3, p. 29-44, Aug. 2003.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 5, n°. 8, p. 31-39, Nov. 1985.
- POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-Level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 31, n°. 3, p. 334-340, Mar. 2005.
- PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of therapy of laser of low level in biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 307-313, jan. 2003.
- REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 33, n°. 5, p. 344-351, Dec. 2003.
- SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H; MOSSBACHER, U; SCHINDL, L. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer – long term results of 3 cases. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 16, n°. 1, p. 34-37, Feb. 2000.

---

**Endereço para correspondência:** Francisco Pereira da Silva. Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia, 445 Km 380, Campus Universitário. Cx. Postal 6001. CEP 86051-990. Londrina – PR. E-mail: uelfpereira@hotmail.com

Recebido em: 21/11/2005

Aprovado em: 18/08/2006