

**Artigo original****Os efeitos do laser de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes mellitus experimental*****The effects of low level laser therapy on cutaneous wounds in rats with experimental diabetes mellitus***

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho<sup>\*\*</sup>, Nilton Mazzer<sup>\*</sup>, Adalberto Vieira Corazza<sup>\*\*\*</sup>, Rene Mariano Raduam<sup>\*\*\*</sup>

.....

<sup>\*</sup>Departamento de Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP/SP, <sup>\*\*</sup>Departamento de Fisioterapia UNIDERP/MS, <sup>\*\*\*</sup>Faculdades Salesianas de Lins/SP

**Resumo**

O presente trabalho propõe-se a realização de um estudo sobre os efeitos da terapia laser na regeneração tecidual de feridas cutâneas induzidas em ratos diabéticos e não diabéticos e sua relação com a reparação tecidual. No estudo foram utilizados 15 ratos Wistar, machos. O diabetes foi induzido por injeção intravenosa (veia dorsal do pênis de Aloxana (2, 4, 5, 6 - Tetraoxypyrimidina; 5 - 6 Dioxyuracila) SIGMA, 0,1ml de solução a cada 100 g de peso corporal. Para dar cumprimento ao trabalho foi realizada uma lesão no terço médio do quadríceps dos animais sendo estes divididos em grupo A diabético tratado, B não diabético tratado, C não diabético não tratado. Os animais dos grupos A e B foram tratados com Laser HeNe com uma dosagem de 4 J/cm<sup>2</sup> por 36 s. Destes um de cada grupo foi sacrificado no 3º dia após a lesão e o restante no 7º dia e retiradas as amostras que foram emblocadas em parafina, coradas com *H.E.* e *Tricrômico de*

**Palavras-chave:**

Laser de baixa intensidade, feridas cutâneas, diabetes aloxânico, regeneração tecidual.

---

**Endereço para Correspondência:** Prof. Paulo de Tarso C. Carvalho, Departamento de Fisioterapia UNIDERP, Av. Alexandre Herculano, 4000, Bairro Parque dos Poderes - 79037-280, Campo Grande - MS, Tel: (67) 326-9972, E-mail: ptpaulo@enersulnet.com.br

---

*Masson* e realizada a análise histológica. Das 6 lesões, 3 foram analisadas 72 horas após a sua realização, em um animal de cada grupo. Observou-se através de microscopia de luz que as reações inflamatórias foram idênticas, independentemente do grupo. As lâminas apresentaram área de exsudato inflamatório agudo, com intensa migração de neutrófilos. As 3 lâminas obtidas sete dias após a indução, apresentavam inflamação crônica de duração prolongada, marcada pelas tentativas de reparação do tecido. Nas lâminas do grupo A e B observou-se: tecido de granulação exuberante com presença de fibras colágenas; intensa proliferação fibroblástica; e células inflamatórias mononucleadas, principalmente linfócitos e macrófagos; neoformação de vasos sugerindo reposição de tecido conjuntivo por um processo envolvendo angiogênese e fibroblastos. No grupo controle as lâminas apresentavam um intenso exsudato, células inflamatórias, exacerbação de vasos incompletos e fibroblastos. Os resultados indicam que aplicação da laserterapia se mostrou muito eficaz equilibrando e acelerando o processo de reparação das feridas cutâneas em ratos diabéticos.

### **Abstract**

The present work studies on the effect of the laser therapy in tecidual regeneration of induced cutaneous wounds in diabetic and not diabetic rats and its relation with the tecidual repairing. In this study, 15 Wistar rats males had been used. Diabetes was induced for intravenous injection (dorsal vein of the penis of Aloxane (2.4.5.6-tetraoxypyrimidine; 5 - 6 dioxuracil) SIGMA, 0.1ml of solution to each 100 g. of corporal weight. To give fulfillment to the work an injury in quadriceps of the animals was carried through. These animals were divided in group A treated diabetic, B treated not diabetic, C not treated not diabetic. To these one had been dealt with HeNe Laser with a 4 dosages of J/cm<sup>2</sup> for 36 each group was sacrificed in 3<sup>o</sup> day after the injury and the remainder in 7<sup>o</sup> day and withdrawals the samples that had been embrocates in paraffin, coradas with H.E. and Tricrômico de Masson and carried through the histological analysis. Of 6 injuries.3 72 hours had been analyzed in an animal of each group. It was observed through light microscopy that the inflammatory reactions had been identical, independents of the group. The blades had presented area of acute inflammatory exsudato, with intense migration of neutrófilos. The 3 gotten blades seven days after the induction, presented chronic inflammation of duration drawn out, marked for the attempts of repairing of the fabric. In the blades of the group and the B it was observed: fabric of exuberant granulation with colágenas staple fiber presence; intense fibroblástica proliferation; e mononucleadas inflammatory cells, mainly lymphocytes and macrophages; neoformação of vases suggesting conjunctive fabric replacement for a process involving angiogenese and fibroblasts. In the group it has controlled the blades presented an intense exsudato, inflammatory cells, exacerbação of incomplete and fibroblasts vases. The results indicate that application of the laserterapia if showed very efficient balancing and speeding up the process of repairing of the cutaneous wounds in rats day.

### **Key words:**

Low Level Laser Therapy,  
Cutaneous Wounds,  
Diabetes Aloxânico,  
Tecidual Regeneration.

## Introdução

Apesar dos princípios físicos sobre os quais se apóia a amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação terem sido demonstrados e comprovados em 1917 por Albert Einstein, somente na década de sessenta o primeiro feixe de luz laser foi produzido por Maiman [1], entretanto, sua utilização tornou-se mais difundida nos últimos dez anos.

Atualmente o uso do laser encontrou aplicabilidade na aceleração seletiva de diversos processos e funções celulares [2], entre os quais a cicatrização e o reparo de feridas. São vários os autores que se reportam ao tema [3,4,5], entretanto ao nível nacional as pesquisas caminham lentamente. As pesquisas dos efeitos biológicos e fisiológicos do laser abrangem três áreas principais que são: pesquisa celular; estudos em animais e estudos controlados em humanos.

Mester [6] no início dos anos setenta foi o primeiro a utilizar o laser de baixa intensidade na cicatrização e reparo de feridas em humanos. Com base nestes estudos principalmente pela velocidade aumentada da cicatrização, esta modalidade tornou-se popular; contudo, diante do fato de que em muitos estudos publicados até agora os resultados não são exclusivamente positivos [7], justifica-se a realização de novos estudos referentes à cicatrização de feridas.

O tema cicatrização de feridas se torna mais agravante quando nos referimos a diabéticos, devido às alterações neurotróficas e na morfologia dos vasos sanguíneos [8] que dificultam o reparo tecidual principalmente na segunda fase do processo denominada proliferação, onde a fase inflamatória é seguida pela formação de tecidos de granulação, sendo este formado por um conjunto celular contendo macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e uma matriz de tecido conjuntivo [9].

Considerando estas premissas, o presente estudo teve como objetivo verificar a correlação entre a regeneração tecidual de feridas cutâneas induzidas em ratos diabéticos e não diabéticos, submetidos à radiação do laser de baixa intensidade.

## Metodologia

Para dar cumprimento a pesquisa o modelo animal escolhido foi o rato da raça *Wistar* pelas seguintes razões: sua ampla utilização em pesquisas biomédicas, facilidade de manutenção, manuseio e padrão estabelecido das características que o animal apresenta ao diabetes induzido pelo *Aloxana*. A amostra foi composta de 15 animais machos, sendo que houve a morte de 9 devido à anestesia pela inalação de Éter etílico e hiperglicemia. Os pesos corpóreos variaram de 200 a 300 gramas, mantidos em fotoperíodo de 12 horas, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da utilização dos mesmos no experimento. Os animais foram alimentados antes e durante todo o experimento com ração sólida e água à vontade. Os níveis de glicemia e variações de peso corpóreo foram monitorados ao longo de todas as etapas do experimento. O diabetes foi induzido em oito animais, mediante a injeção de *Aloxana*. Dos animais induzidos somente 4 atingiram o nível ideal de glicemia para o diabetes. Em uma etapa posterior, foi realizada ulceração do terço médio do quadríceps. Vinte e quatro horas após a cirurgia iniciou-se a aplicação do laser Hélio Neônio com dosagem de 4 joules por centímetro quadrado por 7 dias consecutivos. Ao final do tratamento convencional, os animais foram sacrificados com inalação de Éter etílico e colhidas amostras de tecido epitelial ulcerado e normal em cunha, respeitando a extensão e profundidade das feridas e colocado em recipiente contendo solução de Formal a 10%, sendo enviado para análise histológica. Para o estudo anátomo-patológico, os fragmentos foram emblocados em parafina e corados com H.E. e Tricrômico de Masson.

## Equipamento laser utilizado

O aparelho foi o Laser HeNe plasmax IV, LHN 9709 da marca KLD Biossistemas com potência contínua máxima de 5 mW comprimento de onda de 632,8nm visível.

### Indução do diabetes aloxânico

Os animais ficaram em jejum prévio por 24 horas, pois nestas condições tornavam-se mais susceptíveis ao diabetes. Após anestesia por inalação de Éter etílico, eram contidos em decúbito dorsal, para receber uma injeção intravenosa – veia dorsal do pênis de Aloxana (2, 4, 5, 6, - Tetraoxyppyrimidina; 5 – 6 – Dioxuryracila) – SIGMA. De uma solução estoque de 50mg de Aloxana e 0,8 ml de soro fisiológico preparada no momento da sua utilização, aplicava-se 0,1 ml de solução a cada 100 gramas de peso corporal, resultando em dose final de 62,5 mg de Aloxana/kg de peso [11]. Decorrida 6 horas após a injeção, os animais foram tratados com glicose adicionada à água, para evitar convulsões e morte comuns na fase hipoglicêmica. Após 24 horas foi retirada a glicose da água. Para constatar o diabetes utilizou-se o seguinte padrão de monitoramento glicêmico: Verificação da glicemia antes da indução ao diabetes, verificação da glicemia 72 horas após a indução ao diabetes, sendo que os animais que não apresentaram valores iguais ou superior a 250 miligramas por decilitro de sangue foram descartados, verificação da glicemia no quinto dia do tratamento para confirmação da permanência do diabetes e finalmente verificação do diabetes no dia do sacrifício para avaliar qualquer processo de reversão do diabetes. As verificações foram feitas retirando-se sangue da veia da cauda sendo colocada uma gota sobre fitas reagentes da marca Advantageã e a leitura feita em um Glucometer.

Fig.1

Caso	L	V	B	F
D.T 1 – 72 horas	+++	+	-	-
D.T 2 – 07 dias	++	++	++++	+
N.D.T 3 – 72 horas	+++	+	+	-
N.D.T 4 – 07 dias	++	++	++++	+
N.D.N 5 – 72 horas	+	+	+	-
N.D.N 6 – 07 dias	++++	+++	-	-

Dados Microscópicos; L = Neutrófilos; V = Números de Vasos; F= Fibrose; B= Número de Fibroblastos

D.T.: Diabético Tratado; N.D.T: Não Diabético Tratado; N.D.N: Não Diabético Não Tratado

\* Leitura em escala semi-quantitativa

(-) = Mínimo ou Ausente; + = Discreto; ++ = Moderado; +++ = Intenso; ++++ = Muito Intenso.

### Indução das feridas cutâneas

Foi utilizado anestésico *Quetamina*, sendo que para cada 100 gramas de peso corporal foi utilizado 0,2 ml de anestésico [10]. O tempo de anestesia proporcionado pelo anestésico foi de 55 minutos sem alteração nos parâmetros fisiológicos e demais funções gerais.

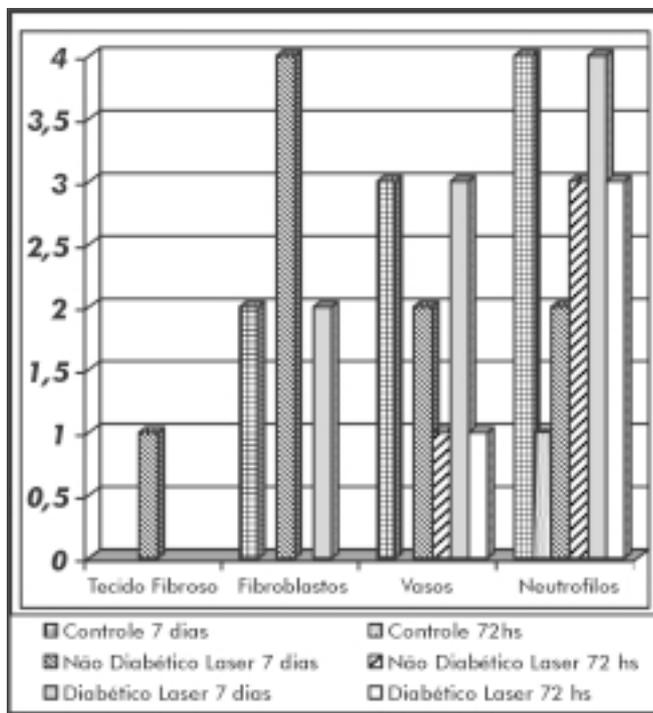
Assim foi realizado um procedimento cirúrgico com bisturi nº 20 promovendo uma lesão com diâmetro de 2 cm e 0,5 de profundidade no terço médio do quadríceps. Os animais que morreram foram substituídos para dar continuidade à pesquisa.

### Tratamento

Os animais foram divididos em três grupos distintos A, B, C contendo dois animais em cada grupo, sendo que cada animal recebeu uma designação como: Grupo A Cobaias I e II diabéticas Tratadas; Grupo B Cobaias III e IV não diabéticas tratadas; Grupo C Cobaias V e VI não diabéticas, não tratadas.

Cada animal do grupo A e B foi tratado com Laser HeNe com dosagem de 4j/cm<sup>2</sup> em uma área de 3 cm<sup>2</sup>, durante 36 segundos em cada lesão. O grupo C foi adotado como grupo controle comparativo para o resultado da análise

Fig.2 - Gráfico Comparativo das amostras analisadas



macroscópica e microscópica na remodelação epitelial das lesões. Os animais I e III receberam três aplicações de laser, assim após 72 horas estes animais mais a cobaia V foram sacrificados por inalação de Éter etílico e foram retiradas as amostras e conservadas em Formol a 10%. Este procedimento foi adotado para analisar quais são os benefícios da laserterapia na fase inflamatória e na fase inicial da proliferação.

Os animais II e IV receberam sete aplicações de laser e no término do tratamento foram sacrificados, mais a cobaia VI, sendo adotado o mesmo procedimento já descrito anteriormente.

## Resultados

Todos os dados colhidos são descritos na Fig.1 em escala semiquantitativa e plotados na Fig.2, onde o eixo das ordenadas representa o os valores de zero a quatro de intensidade das ocorrências na escala semi-quantitativa, o eixo das abscissas representa os achados da microscopia .

Os valores amostrais dividiram-se basicamente em três grupos, constando o período da retirada da amostra, se foi tratada ou não e ainda se eram diabéticas.

## Discussão e Conclusões

Segundo Robbins [12], a inflamação é a reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local, esta pode ser causada por infecções bacterianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecidos necróticos e por reações imunológicas. O papel da inflamação é conter e isolar a lesão, destruindo os microorganismos invasores, atingindo a cura e o reparo, entretanto, a inflamação e o reparo provocam reações de hipersensibilidade, lesão progressiva do órgão e fibrose. Os tecidos objeto de estudo desta pesquisa não diferentemente do que foi citado acima passaram por todas estas etapas que serão discutidas a seguir. Das seis lesões em questão, três foram analisadas 72 horas após a sua realização, sendo que a primeira foi desenvolvida em cobaias diabética, a terceira em uma cobaia não diabética e a quinta no grupo controle. Obser-

va-se através da microscopia, que as reações inflamatórias apresentadas pelos animais I e III foram idênticas, independentemente do grupo ser diabético ou não. Os eventos da inflamação aguda ocorrem com a mesma intensidade. Já o animal V, sua análise foi prejudicada, devido a falhas técnicas. Observa-se que tanto o animal I como o III apresentam área de exsudato inflamatório agudo, com intensa migração de neutrófilos, não existindo ainda nesta fase o aparecimento de fibroblastos e evidentemente tecido fibroso. Observa-se também a existência de alguns poucos vasos neoformados. As três lâminas seguintes obtidas sete dias após a indução da lesão, foram divididas em animal II cobaia diabética tratada através do laser, animal IV cobaia não diabética tratada por laser e animal VI não diabético e não tratado. Todas as cobaias em questão apresentaram inflamação crônica de duração prolongada, marcada pelas tentativas de reparação do tecido. Na análise histológica dos tecidos do animal II, há presença de tecido de granulação exuberante com presença evidenciada de fibras colágenas e intensa proliferação fibroblástica, existindo ainda, um número moderado de células inflamatórias mononucleadas, principalmente linfócitos e macrófagos. Observa-se ainda um número de moderado para intenso de neoformações de vasos, sugerindo reposição de tecido conjuntivo por processo envolvendo angiogênese e fibroblastos. Durante a análise dos tecidos do animal IV, observa-se a mesma reação citada anteriormente em número e grau, levando-nos a acreditar que a aplicação da laserterapia se mostrou muito eficaz equilibrando e acelerando o processo de reparação nas cobaias diabéticas. Os resultados alcançados diferem dos estudos existentes [12], pois as amostras deveriam apresentar um retardo no processo de reposição tecidual. Quando os tecidos analisados anteriormente são comparados com o animal controle denominado VI, os achados se tornam ainda mais claros, visto que este por não ser tratado, apresentava um intenso exsudato difuso, comprometendo todas as estruturas do órgão denominado fleigmão ou celulite. Observa-se, ainda, exacerbação do número de vasos e fibroblastos, sendo que os primeiros apresentavam-se incompletos. Um

outro fator que marca estes tecidos é o achado de número intenso de neutrófilos. O que nos leva a afirmar que o tecido em questão apresentava uma fase inflamatória crônica com reação aguda.

Diante do que foi evidenciado na pesquisa, apesar da literatura demonstrar que o diabetes retarda e dificulta o processo de reparação tecidual, observou-se que a utilização do laser na reparação de feridas cutâneas, apresenta grande eficiência, demonstrando resultados semelhantes em número e grau, tanto em cobaias diabéticas quanto nas não diabéticas, proporcionando em ambos os casos grande presença de tecido de granulação, com fibras colágenas, intensa proliferação de fibroblastos e neoformação de vasos sanguíneos o que sugere uma aceleração na reparação tissular.

#### Referências

1. BaxterGD, Walsh DM, Lowe AS. Therapeutic Lasers: Theory and Practice. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
2. Rajaratnam S, Bolton P, Dyson M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. *Laser Therapy* 1994;6:107-112.
3. Kana JS. Effects of low – power density laser radiation on healing dermal wounds in animal model. *Physical Therapy* 1981;116:293-297.
4. Schindl A. Diabetic neuropatic foot ulcer: successful treatment by low – intensity laser therapy. *Dermatology*.1999;3: 314-316.
5. Fleming K. Laser therapy for the treatment of venous leg ulcers. *J. Tissue Viability* 1999;9(2);67-69.
6. Mester E, Korenyl-Both A, Spiry T. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers. *Zetschrift Exprimmentelle Chirurgie* 1975;8:258-262.
7. Abergel RP, Lyons RP, Castel JC. Biostimulation of wound healing by lasers; experimental approaches in animal models and fibroblast cultures. *Journal of Dermatological Surgery Oncology* 1987;13:127-133.
8. Rubin E, Farber JL. Pathology. Philadelphia : J.B. Lippincott, 1988
9. Dyson M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;7(3):116-121.
10. Massone F. Anestesiologia veterinária, farmacologia e técnicas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994
11. Duarte ACGO. Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultrasônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico. Dissertação Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1996.
12. Robbins SL. Cotran R, Kumar V. Patologia estrutural e funcional. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.