



EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS

Effects of low-intensity lasertherapy on the cicatrization of cutaneous lesions in diabetic rats

Ellen do Socorro Cruz de Maria¹, Denner Brito Ferreira², Renato da Costa Teixeira³, Flávia Lobato Maciel⁴,
Jorgeane Pedrosa Pantoja⁵, Marta Caroline Araújo da Paixão⁶, Rosa Costa Figueiredo⁷,
George Alberto da Silva Dias⁸, Anderson Bentes de Lima⁹

ISSN: 2178-7514

Vol. 15 | Nº. 1 | Ano 2023

RESUMO

Objetivou-se investigar os efeitos da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas em ratos diabéticos. Para isto, ratos diabéticos foram distribuídos, aleatoriamente, em 2 grupos distintos, com 15 animais cada um, o grupo experimento laser e grupo controle. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com 5 animais para realizar a avaliação temporal no 7º, 14º e 21º dia. A lesão foi induzida com puch metálico, medindo 1.5 cm de diâmetro. Após análise macroscópica, observou-se contração da lesão significante em todos os grupos. Na comparação intergrupos, no período de 7 dias, o tratamento com o laser resultou em maiores índices de cicatrização. No período 14 dias, não se observou diferença significativa entre os grupos. Enquanto que com 21 dias de tratamento, o grupo controle teve maior regressão da lesão se comparado ao grupo tratado com o laser. Embora a diferença entre os períodos analisados não tenha sido homogênea, uma menor área lesada pôde ser observada nos grupos que receberam tratamento nas fases iniciais, o que pode ser considerado clinicamente relevante.

Palavras-chave: Laser, Diabetes Mellitus, Cicatrização.

ABSTRACT

The objective was to investigate the effects of low-intensity laser therapy on the healing of skin lesions in diabetic rats. For this, diabetic rats were randomly distributed in 2 different groups with 15 animals each: the laser experiment group and the control group. Each group was subdivided into three subgroups with 5 animals to perform the temporal evaluation on the 7th, 14th and 21st day. The lesion was induced with a metallic punch, measuring 1.5 cm in diameter. After macroscopic analysis, significant lesion contraction was observed in all groups. In an intergroup comparison, over the 7-day period, laser treatment resulted in higher healing rates. In the 14-day period, no significant difference was observed between the groups. While with 21 days of treatment, the control group had greater lesion regression when compared to the laser-treated group. Although the difference between the analyzed periods was not homogeneous, a smaller injured area could be observed in the groups that received treatment in the early stages, which may be considered clinically relevant.

Keywords: Laser, Diabetes Mellitus, Healing.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ,
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ,
UNIVERSIDADE DA AMAZÔNIA,
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ,
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ,
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ,
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

Autor de correspondência

Ellen do Socorro Cruz de Maria - ellenmariafisio@gmail.com

DOI: [10.36692/v15n1-18](https://doi.org/10.36692/v15n1-18)

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é definido como uma desregulação do metabolismo da glicose resultado de alterações na secreção de insulina, da reduzida sensibilidade à esse hormônio ou da combinação de ambos, o que leva à hiperglicemia crônica, além de complicações subsequentes. Os sintomas clínicos mais comuns são sede excessiva, poliúria, perda de peso anormal, fraqueza e susceptibilidade a certas infecções¹.

Dentre as complicações, é importante ressaltar as lesões ulcerativas, as quais são desencadeadas pelo quadro de Doença Vascular Periférica (DVP) associada a presença de neuropatia sensitivo-motora periférica. A DVP é decorrente da aterosclerose das artérias periféricas, que leva à obstrução das artérias e arteríolas distais, dificultando o fluxo sanguíneo e privando os tecidos de adequado fornecimento de oxigênio, nutrientes e antibióticos, o que prejudica a cicatrização das úlceras e pode, consequentemente, levar à gangrena².

Neste cenário, para auxiliar na recuperação dessas lesões podem ser utilizadas técnicas fisioterapêuticas com o objetivo de estimular a reparação tecidual, aumentando a velocidade de cicatrização e possibilitando a reinserção desse paciente em suas atividades diárias. Dentre esses recursos, a laserterapia de baixa intensidade tem se mostrado eficaz no processo de cicatrização de feridas³.

Sendo assim, torna-se relevante a investigação de terapêuticas eficazes e de baixo custo, capazes de acelerar a cicatrização cutânea de indivíduos diabéticos, melhorando a qualidade de vida e diminuindo despesas com o tratamento.

Desta forma, objetivou-se investigar os efeitos do LASER de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas de ratos diabéticos.

MÉTODOS

Aspectos Éticos

Para realização deste estudo, obedeceu-se à Lei Federal n.º 11.794, sendo respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA), conforme protocolo nº 19/2017.

Caracterização da Amostra

Para o estudo, utilizaram-se 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com idade de 8 a 10 semanas, pesando entre 200 a 300g, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e mantidos no Biotério Luiz Carlos de Lima Silveira na Universidade do Estado do Pará. A composição dos grupos foi realizada por conveniência.

Indução do Diabetes

Para a indução do diabetes, os animais foram submetidos a jejum de 24h, e após este período, foi injetado, via intraperitoneal, o fármaco aloxanamonohidratada na dose de 150mg/Kg diluída em solução salina. Antes e após 72 h a partir da indução obteve-se a dosagem da glicemia dos animais com o aparelho Biocheck (ACCU CHECK Active), por meio de uma amostra de sangue coletada da cauda do animal. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentassem concentrações de glicose no sangue com valores iguais ou superior a 200 mg/dl.

Indução da Lesão

Confirmado diabetes, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com uma associação de Cetamina e Xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente). Seguido de epilação por tração digital para retirada total do pelo desde sua raiz, da região do dorso do animal, formando uma área delimitada medindo 5 x 6 cm, na qual a lesão cutânea foi induzida. Posteriormente foi realizada a antisepsia em toda a região epilada.

Seguindo a linha mediana no centro da região previamente preparada foi demarcada a área da rescisão da pele para produção da ferida no plano transversal, com seu centro na linha mediana dorsal seguindo em sentido caudal, iniciando-se a 1,0 cm da margem inferior da escápula. Dessa forma, a lesão foi induzida através da excisão cirúrgica da pele em formato

circular medindo 1,5 cm de diâmetro, com auxílio de um punch metálico. A hemostasia foi realizada por compressão digital, com gaze estéril por aproximadamente 1 minuto.

Após o procedimento, os ratos foram devidamente marcados e distribuídos, aleatoriamente, em 2 grupos distintos, com 15 animais cada um, sendo que receberam a seguinte designação: GEL (Grupo Experimento LASER), tratado com LASER e GC (Grupo Controle) não tratado.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com 5 animais para realizar a avaliação temporal no 7º, 14º e 21º dia após a cirurgia. Esses subgrupos foram denominados: GEL7, GEL14 e GEL21; GC7, GC14 e GC21.

Descrição do Tratamento

O tratamento com o LASER foi realizado uma hora após a lesão, e nos dias seguintes sempre no mesmo horário. Foi utilizado o aparelho modelo LASER HTM Compact AlGaInP, com comprimento de onda de 658 nm, vermelho, emissão contínua, potência de 30 mW pico, potência média de 10 mW, área do feixe de 0,1 cm², obedecendo o tempo determinado pelo aparelho para cada ponto, na frequência de 2,5KHz, densidade de energia 4 J/cm², energia por ponto de 0,3 J. A aplicação pontual, em 15 pontos, sem contato (distância aproximada de 1 mm), sendo a caneta perpendicular à ferida, em pontos equidistantes em torno dela, contemplando toda a sua borda.

Para tal os animais foram imobilizados, por meio do contensor para ratos seguindo o modelo de Genaro9, fabricado com uso de tubos PVC de 50mm, cortados na superfície formando uma abertura de 5 x 6cm que permitiu a exposição do dorso dos animais. Nas extremidades do tubo foram encaixadas tampas de cano PVC de 50mm para evitar que o animal saísse do contensor enquanto estava sendo tratado.

De acordo com seus grupos e após análise macroscópica da ferida, os animais foram submetidos a eutanásia por decaptação no 7º, 14º e 21º dia após a lesão.

Análise dos Dados

Para a análise macroscópica, todos os animais tiveram suas lesões fotografadas por câmara digital modelo “Power Shot AS100” (Nikon®, Tokyo, Japão), 16.0 mega pixels e mantida em tripé a distância constante de 34 cm. Os dados assim obtidos do processo de cicatrização, no 7º, 14º e 21º dia, foram registrados em protocolo e comparados, por planimetria digital, mediante aplicação do software Image J que é um processador e analisador de imagens em JAVA de domínio público, este software calcula automaticamente a área da úlcera em mm².

Após calculadas as áreas de cada úlcera pelo software foi feito o cálculo do índice de cicatrização das úlceras (ICU) pela seguinte fórmula: $ICU = (\text{Área inicial} - \text{Área final}) / \text{Área inicial}$.

Análise Estatística

Para análise estatística inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para a escolha do teste a ser usado. Posteriormente foi feito a análise intragrupos (GEL21, GEL14, GEL7, GC21, GC14, GC7) comparando-se os dados da ferida inicial e final através do Teste t Student. Posteriormente foi realizado a análise intergrupos (GEL2-GC21, GEL14-GC14, GEL7-GC7) comparando-se os dados relativos ao ICU de cada grupo por meio do teste ANOVA, seguido do pós-teste Tukey. Em todos os testes trabalhou-se com um nível de significância com $p\text{-valor} \leq 0,05$.

RESULTADOS

A comparação entre as áreas das feridas inicial e final, de cada grupo, demonstrou que a contração da lesão foi satisfatória em todos os grupos, como demonstrado na Tabela 1.

Na análise intergrupos, no período de 7 dias, o tratamento com o LASER, resultou em maiores índices de cicatrização, indicando maior efetividade quando comparado ao grupo controle ($p = 0.007$). Conforme demonstrado na Figura 1.

No período 14 dias, não se observou diferença significativa entre os grupos ($p = 0.583$). Os dados estão expostos na Figura 2.

Enquanto que com 21 dias de tratamento, o grupo controle teve maior regressão da lesão se comparado ao grupo tratado com o LASER ($p = 0.009$). (Figura 3).

DISCUSSÃO

O processo de cicatrização envolve uma cascata perfeita e coordenada de células e eventos moleculares para a reparação de tecidos lesados. Surge como resposta do tecido a lesões induzidas por trauma ou por procedimentos cirúrgicos sendo caracterizado por três fases que se sobrepõem e apresentam característica específicas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação¹¹.

Quando se fala em indivíduos diabéticos, todo o processo de cicatrização é mais lento, o que pode estar relacionado com a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição do óxido nítrico, diminuição da resposta aos fatores de crescimento e das proteínas da via de sinalização da insulina¹².

A hiperglicemia ocasiona o aumento de ERO, reduz os níveis de Óxido Nítrico (NO) ativando a aldose redutase. O aumento do fluxo pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ERO, determina maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo fatores antioxidantes e aumentando o estresse oxidativo¹³.

Os grupos tratados com o laser, também obtiveram redução significativa das lesões. O que pode ser explicado por seus efeitos primários da fotobiomodulação como a estimulação da atividade fagocitária dos macrófagos, aumento na proliferação de diversos tipos celulares, maturação e locomoção de fibroblastos e linfócitos, além da estimulação das fases

subseqüentes de proliferação e remodelação²⁰.

Andrade, Clark e Ferreira²¹ também observaram que a laserterapia de baixa potência quando utilizada para o tratamento de lesões cutâneas é capaz de promover como principais efeitos fisiológicos resposta anti-inflamatória, neoangiogênese, proliferação epitelial e de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração da ferida.

Nossos resultados coincidiram com os estudos de Feitosa⁸ e Calisto²² que utilizando os mesmos parâmetros propostos nesta pesquisa, observaram diminuição significativa no tamanho da úlcera.

Porém, quando comparado ao grupo controle, apresentou significância apenas no 7º dia. Fato discutido por Sousa²³ após utilizar o laser com densidades de 5 J/cm², 8 J/cm² e analisar outros estudos, levanta a hipótese de que baixas dosagens na aplicação da laserterapia são mais eficazes no processo inicial da cicatrização, enquanto que doses maiores são mais eficientes na fase remodeladora do que na fase aguda.

Observa-se ainda que não há consenso sobre o uso da laserterapia na cicatrização tecidual, bem como acerca dos melhores parâmetros a serem utilizados.

Através dos dados apresentados, o laser pode ser considerados adjuvantes no tratamento de feridas em ratos diabéticos, a contração das mesmas, no recorte temporal de 7 dias.

Os motivos para a ausência de significância em 14 dias, e a sobreposição do grupo controle no 21º dia, não estão completamente esclarecidos na literatura. Considerando as fases inflamatórias e os processos envolvidos na reparação tecidual, outros tipos de análises seriam necessárias para o entendimento de tais resultados. Fato que se apresenta como limitação deste estudo.

CONCLUSÃO

Embora a diferença entre os períodos analisados não tenha sido homogênea, uma menor área lesada pôde ser observada no grupo tratado nas fases iniciais, o que pode ser considerado clinicamente relevante. Desta forma, sugere-se que futuros estudos sejam realizados com diferentes parâmetros e com o uso de outras ferramentas, como a determinação de tipos de colágeno e técnica imunohistoquímica. Desta forma, acredita-se que podemos ampliar o conhecimento e expor ainda mais os mecanismos indicados na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Canivell, S, Gomis, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews* 2014 Apr-May; 13(4-5): 403-7.
- Júnior, AHA, Amaral, LAH, Bastos, MG, Nascimento, LC, Alves, MJM, Andrade, MAP. Prevenção de lesões de membros inferiores e redução da morbidade em pacientes diabéticos. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2014 Sept-Oct; 49(5): 482-487.
- Beckmann, KH, Meyer-hamme, G, Schröder, S. Low Level Laser Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: A Critical Survey. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014 Mar; 2014.
- Macedo, JL, Pereira, IC, Oliveira, ASSS, Magnólia, JSM. Phytotherapy effectiveness in the process of healing of patients with diabetes mellitus tissue diagnosis. *ReonFacema* 2017 Jan-Mar; 3(1): 396-400.
- Souza, MO, Santos, RC, Pedrosa, ML. Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius): composição química e bioatividades. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* 2011 Nov; 36(2): 161-169.
- Portinho, JÁ, Zirmenmam, LM, Bruck, MR. Efeitos benéficos do açaí. *International Journal of Nutrology* 2012; 5(1): 15-20.
- Abuelgassim, AO. Effect of *Acacia nilotica* fruit extract on serum glucose and lipid concentrations in alloxan-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2013 Nov; 16(21): 1398-1402.
- Feitosa, MCP, Carvalho, AFM, Feitosa, VC, Coelho, IM, Oliveira, RA, Arisawa, EAL. Effects of the Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the process of healing diabetic foot ulcers. *Acta Cir. Bras* 2015 Dec; 30(12): 852-857.
- Genaro, JT. Estimulação com corrente pulsada de alta voltagem na cicatrização de áreas cruentas: modelo experimental com ratos wistar. *Dissertação [Mestrado em Ciências da Cirurgia]* Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2013.
- Machado, LCS, Pfrimer, IAH, Magalhães, MR. Cicatrização de feridas induzidas por peçonha de *bothrops moojeni* pelo extrato de *croton urucurana*. *Estudos* 2015 Out-Dez; 42(4): 597-611.
- Martelli, A, Theodoro, V, Zaniboni, VE, Freitas, BA, Pastre, GM, Melo, KM et al. Microcorrente no processo de cicatrização: Revisão de literatura. *Arch Health Invest* 2016; 5(3): 134-139.
- Lima, MHM, Araújo, EP. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. *CogitareEnferm* 2013 Jan-Mar; 18(1): 170-2.
- Denadai, AS. Análise dos efeitos agudos do laser de baixa intensidade (660nm) sobre os níveis de estresse oxidativo de ratos diabéticos com feridas na pele. *Tese [Doutorado em Saúde e Desenvolvimento]* Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2013.
- Otterço, AN, Brassolatti, P, Andrade, ALM, Avó, LRS, Bossini, PS, Parizotto, NAE. Effect of photobiomodulation (670 nm) associated with vitamin A on the inflammatory phase of wound healing. *Lasers in Medical Science* 2018 Dec; 33(9): 1867-1874.
- Andrade, FSSD, Clark, RMO, Ferreira, ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2014 Mar-Apr; 41(2): 129-133.
- Calisto, FCFS, Calisto, SLS, Souza, AP, França, CM, Ferreira, APL, Moreira, MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir. Bras.* 2015 Mar; 30(3): 204-208.
- Sousa, RC, Filho, ALMM, Nicolau, RA, Mendes, LMS, Barros, TL, Neves, SMV. Action of AlGaInP laser and high frequency generator in cutaneous wound healing. A comparative study. *Acta Cir. Bras.* 2015 Dec; 30(12): 791-798.

OBSERVAÇÃO: Os autores declaram não existir conflitos de interesse de qualquer natureza.

TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Médias iniciais e finais das áreas de lesão

GRUPOS	ÁREA INICIAL	ÁREA FINAL	P-VALOR
GEL 7 DIAS	98.022	8.124	< 0.0001
GEL 14 DIAS	139.48	12.11	0.0022
GEL 21 DIAS	124.532	61.464	0.0061
GC 7 DIAS	119.058	98.86	0.0774
GC 14 DIAS	102.4	10.32	< 0.0001
GC 21 DIAS	99.742	2.404	<0.0001

Grupo Experimento Laser (GEL), Grupo Controle(GC), Grupo Experimento Extrato (GEE) ao 7º, 14º e 21º dias (em mm²). t *Student*, $p \leq 0,05$.

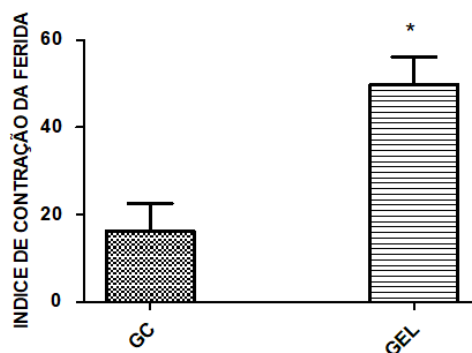


Figura 1. Comparação entre os índices de cicatrização da ferida dos grupos Controle (GC) e Experimento Laser (GEL), ao 7º dia. Análise de variância (ANOVA), $p \leq 0,05$.

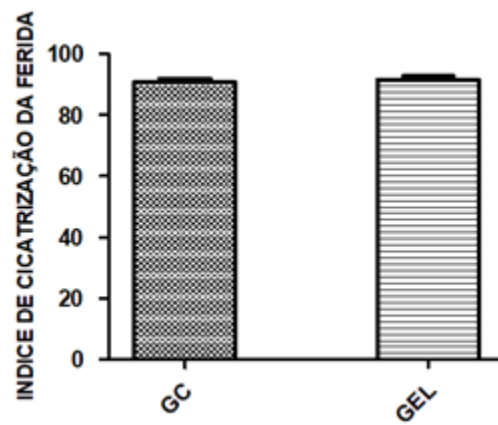


Figura 2. Comparação entre os índices de cicatrização da ferida dos grupos Controle (GC) e Experimento Laser (GEL) ao 14º dia. Análise de variância (ANOVA), $p \leq 0,05$.

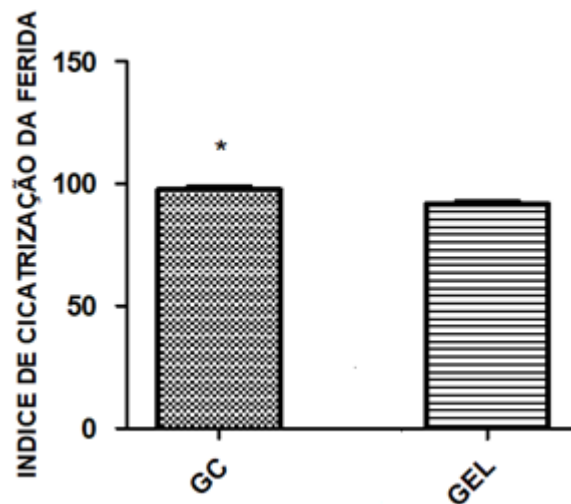


Figura 3. Comparação entre os índices de cicatrização da ferida dos grupos Controle (GC) e Experimento Laser (GEL) ao 21º dia. Análise de variância (ANOVA), $p \leq 0,05$.