

# ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DOS EFEITOS DO LASER DE 830 nm EM LESÕES EXPERIMENTAIS EM MÚSCULOS DE RATOS

**Allison Gustavo Braz<sup>1</sup>, Rodrigo Antônio Carvalho Andraus<sup>2</sup>, Luís Ferreira Monteiro Neto<sup>3</sup>, Celina Santaella<sup>4</sup>, Mairto Roberis Gerome<sup>5</sup>, Daniela Aparecida Sussai<sup>6</sup>, Newton Camargo<sup>7</sup>, Luiz Eduardo Birelli Cavalcanti<sup>8</sup>, Fernando Henrique Alves Pereira Machado<sup>9</sup>, Renato Aparecido de Souza<sup>10</sup>, Enio Thalles Batista de Faria<sup>11</sup>, Egberto Munin<sup>12</sup>.**

<sup>1</sup>IMES-FAFICA, allisonbraz@hotmail.com

<sup>2</sup>IMES-FAFICA, rodrigo\_andraus@hotmail.com

<sup>4, 6-9</sup>UNISALESIANO, lulalins@hotmail.com

<sup>4</sup>FAMECA, celinasr@terra.com.br

<sup>5</sup>FAMECA, mgeromel@uol.com.br

<sup>11</sup>IP&D UniVap, thallesfisio@yahoo.com.br

<sup>10</sup>IP&D UniVap, renato@univap.br

<sup>12</sup>IP&D UniVap, munin@univap.br

**Resumo** - O objetivo desse estudo foi analisar as principais alterações na área de lesão, área de necrose e área de regeneração no processo de cicatrização muscular com enfoque no décimo dia após a indução de lesões traumáticas na musculatura de ratos que posteriormente foram tratados com laser de baixa intensidade ( $\lambda=830\text{nm}$  e potência de 150mw). Esse tipo de lesão é comum em atividades esportivas. Os ratos foram divididos em 3 grupos experimentais (n=8): o grupo controle (GC), o grupo tratado com uma energia absoluta de 0,6J (GI) e o grupo tratado com uma energia absoluta de 6J (GII). Na análise histopatológica foi constatada, no décimo dia experimental, uma menor área de lesão e uma aceleração na regeneração nos grupos GI e GII, comparado ao GC. O mesmo também foi observado na área com necrose, onde os grupos GI e GII mostraram melhores resultados que o GC.

**Palavras-chave:** laser, trauma direto, lesão muscular.

**Área do Conhecimento:** III Engenharias

## Introdução

A lesão muscular por trauma direto é uma das principais causas do afastamento de atletas de atividades esportivas sendo eles, atletas de fim de semana ou atletas de alto nível. A rápida reabilitação e uma boa qualidade de reparo muscular envolve um retorno mais rápido às atividades físicas e uma menor perda do desempenho esportivo.

Devido ao fato do laser ser muito utilizado em casos de lesões musculares, estipulamos 2 doses para tratar e avaliar a área ainda em necrose, a área ainda em regeneração e a morfometria média do sítio lesado no décimo dia após uma lesão traumática em ratos.

Com a intenção de comparar e avaliar os resultados entre os grupos no tratamento de lesões musculares traumáticas em ratos, elaboramos esse trabalho e observamos os resultados colhidos em um estudo cego laudado por uma patologista.

## Materiais e métodos

Foram utilizados 24 ratos da raça *wistar*, machos, com uma média de 120 dias de vida, pesando  $230\text{g} \pm 44,15\text{g}$ , divididos em 3 grupos (GC, GI e GII) de 8 animais. O método de lesão foi padrão em todos os grupos. O GC não recebeu o tratamento laser, sendo que apenas os grupos GI e GII foram tratados com o laser.

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina com uma proporção média de 0,10ml/100g. Com os animais já anestesiados, foi realizada a tricotomia da pata traseira esquerda, onde seria feita a lesão. Logo em seguida foram produzidas as lesões traumáticas no terço medial da face lateral da região posterior da pata traseira esquerda por um aparato cilíndrico maciço pesando 400g, com 2cm de diâmetro guiado por um tubo para que o cilindro sempre atingisse o mesmo local. O cilindro era abandonado no ar a uma distância de 15cm da pata de cada animal, sendo que esse procedimento foi realizado em um total de 3 vezes consecutivas em cada animal, formando logo após o trauma, uma equimose de forma ovalada com o diâmetro médio similar ao do cilindro. A lesão produzida por golpe ou impacto sem causar dilaceração ou ruptura da pele é

chamada de contusão[1]. Após a lesão, os animais foram colocados em gaiolas de plástico com comida e água à vontade. Na água foi acrescentado dipirona sódica, para a analgesia. As gaiolas foram acomodadas em uma sala com temperatura controlada a 27°C e ciclo de luz/escurecimento de 12/12 horas. O tratamento foi iniciado 24 horas após as lesões com um laser de meio ativo de AlGaAs, com comprimento de onda de 830 nm, potência de 150 mW, divergência de feixe de 15° e área da fibra óptica de 0,02 cm<sup>2</sup>.

O tratamento foi padronizado usando-se a técnica pontual com contato em 4 pontos equidistantes ao redor da lesão e mais um ponto no centro da lesão, totalizando cinco pontos de aplicação por sessão em ambos os grupos. No GI em cada ponto foi depositado 0,12J de energia em 0,8 segundo, totalizando 0,6J. No grupo GII em cada ponto foi depositado 1,2J de energia em 8 segundos, totalizando 6J. O tratamento se deu por 9 dias consecutivos, uma vez por dia sempre no mesmo horário para os grupos GI e GII. No 10º dia pós-lesão todos os animais dos 3 grupos foram sacrificados com dose excessiva de Cloridrato de Ketamina, levando à parada cardíaco-respiratória. Depois de sacrificados, foi retirado o material a ser analisado para o preparo das lâminas, que foram coradas em Hematoxilina-Eosina (H&E) [2]. A patologista recebeu as lâminas para o laudo em um estudo cego e utilizou critérios semiquantitativos como metodologia padrão para a análise da área ainda em necrose do tecido e a área ainda em regeneração do tecido, observando e graduando numericamente em 0 para a ausência do sinal a ser analisado; em 1 para quando a intensidade do sinal era leve; em 2 para quando a intensidade do sinal era moderada e em 3 para quando a intensidade do sinal era acentuada (tabela 3).

Tabela 3: Tabela utilizada pela patologista para graduar a intensidade da presença dos sinais analisados e seu correspondente numérico usado para facilitar a graduação do material observado nas lâminas.

<b>Intensidade da presença dos sinais analisados</b>	<b>Graduação numérica dos sinais analisados</b>
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Acentuado	3

Para o estudo morfométrico foi utilizada uma Régua de Breslow para a medição da área média da lesão, onde para esse estudo mensurou-se o maior comprimento e multiplicou-se pelo menor comprimento da lesão.

## Resultados

No laudo elaborado pela patologista pela leitura das lâminas, nos grupos irradiados foi observada uma menor quantidade de exudato inflamatório e um estágio de maturidade mais avançado das células em reparo, caracterizando uma aceleração no processo cicatricial comparativamente aos grupos não tratados. Ainda nos grupos tratados, o tecido de granulação (área de necrose) desapareceu e foi substituído por tecido cicatricial, enquanto que no grupo controle o tecido de granulação ainda era evidente após os 10 dias.

Nas áreas com necrose o laudo histopatológico revelou que no GC a soma dos valores da graduação patológica dados à necrose foi 8, enquanto a soma do grupo GI foi 4 e a soma do GII foi 2. Na média dos valores, conseguimos obter valores referentes à tabela de metodologia de avaliação utilizada pela patologista (Tabela 3), onde o GC foi considerado leve (1), o GI ficou entre leve e ausente (0,5) e GII ficou ainda mais próximo da ausência de necrose (0,25) indicando assim uma importante diferença entre os grupos irradiados e o GC, mas essa diferença não ficou tão evidente entre os grupos irradiados entre si. A densidade populacional pela graduação patológica a respeito da área de necrose ilustra bem os dados por grupo, onde o gráfico aponta o número de animais que estão em determinada classe da graduação patológica (figura 1).

Na análise da área da quantidade de tecido ainda em reparo (área ainda em regeneração), o grupo GC obteve a soma 14, enquanto sua média ficou em 1,75. O GI ficou com uma área em reparo menor que o GC, com uma soma 11 e média de 1,375. O GII obteve soma 9 e média 1,125 sendo este o grupo que apresentou o melhor resultado. Ambos os grupos irradiados mostraram bons resultados, mas o GII apresentou uma área ainda em reparo com uma média aproximando-se do grau leve, enquanto o GC ficou com a média aproximando-se do moderado. Observamos isso também na densidade populacional pela graduação patológica dos valores dados pela patologista da área ainda em regeneração (figuras 1 e 2).

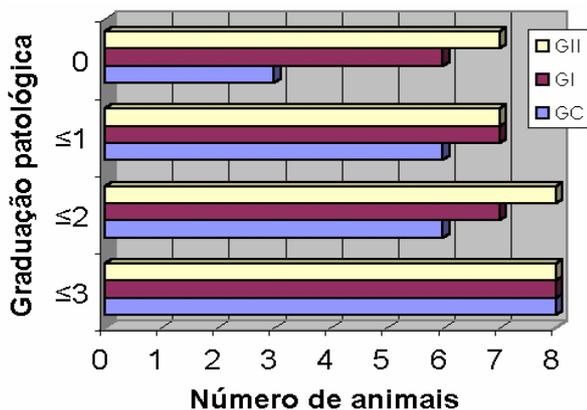


Figura 1: Densidade de população observada em cada grupo pela graduação patológica da área ainda com necrose.

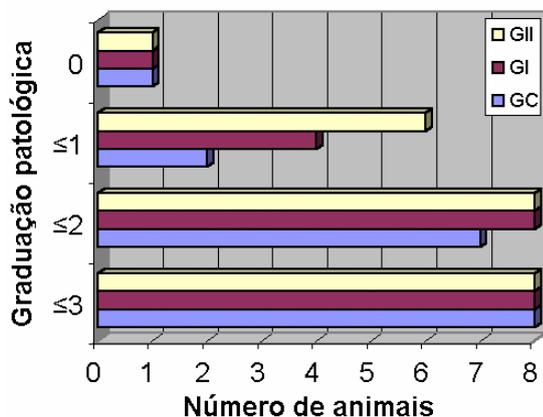


Figura 2: Densidade de população observada em cada grupo pela graduação patológica da área ainda em regeneração.

Na análise morfométrica o GC obteve uma área média de 11,04mm<sup>2</sup>, o GI obteve 6,28mm<sup>2</sup> e o GII obteve 3,90mm<sup>2</sup> de área média ainda lesada. Os grupos irradiados mais uma vez se destacaram contra o GC. Foi observado (figura 3) que o GC apresentou animais com uma maior área de lesão, enquanto que o GII foi o que apresentou animais com menor área de lesão, menor que os dois outros grupos.

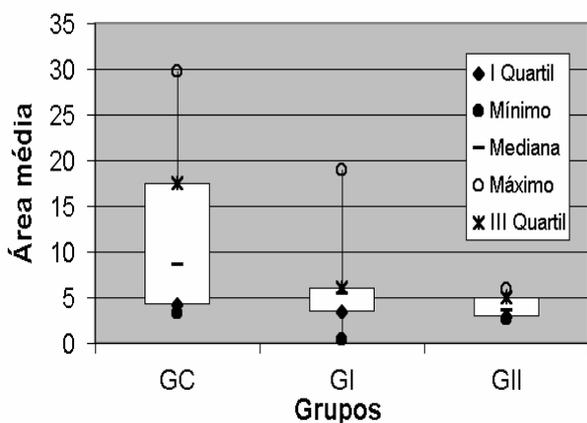


Figura 3: Gráfico mostrando as áreas de lesão nos grupos de estudo após o 10º dia da lesão e os estudos estatísticos.

### Discussão

O presente estudo objetivou verificar os efeitos do Laser de Baixa Intensidade (LBI) na regeneração muscular avaliando as áreas de lesão, regeneração e necrose nos animais submetidos à lesão traumática muscular direta.

O modelo experimental utilizado para o estudo foi o rato, que é largamente usado em muitos estudos importantes com laser em músculos [3-5] entre vários outros trabalhos.

Os animais foram sacrificados no 10º dia após o trauma, pois logo na segunda semana após a lesão, a área lesada já se encontra coberta por fibras colágenas e a queratinização se inicia [6]. Sendo assim, poderíamos fazer uma comparação da quantidade de colágeno depositado entre os grupos e a sua reorganização em um período ótimo em produção de colágeno.

O método lesivo escolhido foi o trauma muscular direto, conhecido no meio médico como contusão, por ser um tipo de lesão comum no meio esportivo, causador de déficit no treinamento e rendimento do atleta pela disfunção biomecânica e dor que o indivíduo é submetido por algum tempo devido à lesão sofrida.

O laser utilizado na pesquisa foi o diodo de comprimento de onda 830nm, por já ter sido usado em outros experimentos que envolviam diretamente o reparo muscular [7] e também por ser um laser com comprimento de onda amplamente comercializado nos dias atuais.

As amostras dos três grupos foram coradas por H&E, por ser uma técnica rotineiramente utilizada e recomendada para observação do colágeno [2].

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que todos os grupos evoluíram para um processo de regeneração muscular normal no período estudado. Entretanto, observando a estrutura analisada histopatologicamente, observa-se uma aceleração na cicatrização do músculo nos grupos irradiados com LBI quando comparados ao controle. Em outro estudo [8] também foi notada regeneração acelerada do tecido muscular lesado. A que tudo indica, com o aumento do metabolismo local as células precisam de mais energia para a produção das proteínas necessárias para a reparação, existindo assim um trabalho maior das mitocôndrias, [7] ocorre uma maior produção de energia pelas mitocôndrias por causa da fotorrecepção da energia emitida pelo laser.

A diminuição da área da lesão, também foi outro fator observado pela análise histopatológica. Tal observação também pode ser constatada em outros trabalhos. Shefer *et al* [9] explicam que na

aplicação laser ocorre uma inibição de uma proteína pró-apoptótica e, além disso, ocorre uma indução da produção de uma proteína anti-apoptótica. Com isso há um decréscimo das células adjacentes à lesão.

Também foi notada uma menor área ainda em regeneração nos grupos tratados com laser. Sugere-se uma redução dessa área por uma série de fatores, tais como a alteração da quantidade de proteínas apoptóticas das células adjacentes à lesão [9], a modulação e aceleração dos processos fisiológicos nas células [8] e devido a aceleração da formação de miotubos [5] a área de lesão fica ainda menor, por causa da competição espacial entre o tecido cicatricial e o tecido muscular pelo reparo, onde ganha mais espaço quem consegue se proliferar mais rapidamente [9].

A diminuição da área de necrose acaba se explicando pela diminuição da morte das células adjacentes à lesão [10]. Quanto mais rápido o tecido necrótico for descartado, mais rápida será a ação das células satélites e com isso, mais rápida será a recuperação do músculo, além de melhorar sua qualidade de reparo diminuindo assim a área fibrótica do tecido.

## Conclusão

Neste trabalho mostramos algumas evidências sobre o LBI que apresentou resultados positivos sobre o processo de regeneração muscular com a metodologia proposta. Concluímos que:

1 - Os grupos irradiados com LBI apresentaram melhores resultados em todos os aspectos analisados tais como: área de lesão, área de regeneração e área de necrose do tecido muscular.

2 - Embora os grupos GI e GII tenham obtido resultados positivos e praticamente iguais, na análise histopatológica, o grupo GII foi o que obteve melhores resultados.

## Referências

[1] Houaiss, A. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. 1ª ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

[2] Junqueira, L. C. Carneiro, J. Histologia básica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

[3] Amaral, A. C. Parizotto, N. A. Salvine, T. F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci*, n. 16, pp.44-51, 2001.

[4] Tavares, M. R. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto

de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. (Mestrado).

[5] Weiss, N. Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrcnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat embryol*, n. 186, pp. 497 – 503, 1992.

[6] Rabelo, S. B. O efeito da fotoestimulação com laser de baixa potência na cicatrização de ferida em ratos portadores de *Diabetes* induzido. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003. (Mestrado).

[7] Carnevalli, M. M. Efeito da radiação do diodo laser ( $\lambda=830\text{nm}$ ) em cultura de fibroblastos (CHO-K1). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001. (Mestrado).

[8] Bibikova, A. Oron, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and promotion of the process by low energy laser irradiation. *Anat rec.*, n. 241, pp. 123 – 128, 1995.

[9] Shefer, G. *et al.* Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*, n. 115, pp. 1461-1469, 2002.

[10] Bassoli, D. A. Avaliação dos efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001. (Mestrado).