

# FOTOTERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE EM PROCESSOS INFECCIOSOS AGUDOS

## *Low-intensity Laser Therapy on Acute Infection Process*

<sup>1</sup> Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP. Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - São Paulo - SP - 05508-900 - Brasil.

Renato Araujo Prates<sup>2</sup>  
Antonio José da Silva Santos<sup>3</sup>  
Daiane Thais Meneguzzo<sup>4</sup>  
Ilka Tiemy Kato<sup>5</sup>  
Martha Simões Ribeiro<sup>6</sup>

### Resumo

A terapia laser em baixa intensidade vem sendo utilizada com o objetivo de promover regeneração tecidual, modulação dos efeitos inflamatórios e redução de processos de dor. Como ela pode induzir aumento na proliferação celular, um possível efeito colateral poderia ocorrer com sua aplicação sobre processos infecciosos agudos, pois poderia estimular o crescimento das células microbianas presentes no tecido. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da irradiação laser em baixa intensidade sobre um processo infeccioso agudo induzido em pata de camundongos. Para isso, foram utilizados dezesseis camundongos BALB/c que após anestesia, receberam inoculação de suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* para induzir o processo inflamatório infeccioso. O edema foi avaliado no grupo controle (sem tratamento) e no grupo submetido à irradiação única com laser ( $\lambda=660$  nm, P=50 mW) com fluência de 3 J/cm<sup>2</sup> sobre a pata esquerda. Os resultados indicaram uma redução no edema no grupo tratado com laser ( $p<0,05$ ), enquanto no grupo controle foi observado persistência do processo inflamatório. Concluiu-se que a irradiação laser não aumentou o processo infeccioso agudo no modelo testado.

**Descritores:** Processo inflamatório, Efeito colateral, Laserterapia

### Abstract

*Low-intensity laser therapy has been used to promote wounding healing, to modulate inflammatory process, as well as to control pain. Cell proliferation, including bacteria, is generally pointed as an effect of laser irradiation, thus it may be interpreted as a possible side effect of this therapy on infected lesions. The aim of this study was to investigate the effect of laser irradiation on acute infectious disease induced in mice. Therefore, back left paw of sixteen BALB/c mice were inoculated with a suspension of *Pseudomonas aeruginosa* to induce acute inflammation following general anesthesia. Edema was evaluated in control group (without treatment), and in the test group, the lesions were treated with laser irradiation ( $\lambda=660$  nm, P=50 mW) with fluence of 3 J/cm<sup>2</sup>. The results indicated that laser group presented reduction on edema size ( $p<0,05$ ), and control group showed a persistent inflammation process. In conclusion, laser irradiation did not increase an acute infection on this experimental model.*

**Descriptors:** Inflammatory process, Side-effects, Lasertherapy

### Endereço:

Renato Araujo Prates. Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP. Av. Prof. Lineu Prestes, 2.242 - Cidade Universitária, São Paulo - SP - 05508-900 - Brasil. Telefone: 11-3133-9255 ou 11-3133-9197 - E-mail: pratesra@usp.br

**Fontes de fomentos:** Os autores são financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**Conflito de interesse:** Nenhum conflito de interesse se aplica a qualquer dos autores responsáveis por este estudo.

## INTRODUÇÃO

A terapia com laser em baixa intensidade, do inglês *low-intensity laser therapy* (LILT), vem sendo utilizada nas diversas áreas da saúde com o objetivo de promover aceleração na regeneração tecidual<sup>1-5</sup>, modulação dos efeitos inflamatórios<sup>6-8</sup> e erradicação ou redução de processos de dor<sup>9</sup>. Estudos mostram que esta modalidade terapêutica pode induzir a liberação de mediadores do processo inflamatório<sup>7, 10</sup>, bem como acelerar a proliferação celular<sup>11</sup>.

O uso da LILT nas áreas biomédicas é um tópico relativamente recente, constituindo-se num campo de pesquisa a ser explorado e que levará ainda muitos anos para que seus mecanismos de ação sejam completamente esclarecidos. Os efeitos biológicos da irradiação laser são relacionados diretamente à absorção da luz pelo tecido ou células alvo.

Estudos demonstraram que a luz, em comprimento de onda e parâmetros de irradiação adequados, atua sobre o sistema de geração de energia das células, e invariavelmente a participação da cadeia respiratória é envolvida<sup>9, 12</sup>. O óxido nítrico (NO) produzido durante a respiração celular pode se ligar ao citocromo-c oxidase e competir por esta ligação com o oxigênio, especialmente em células sob hipóxia ou em condição de estresse<sup>13</sup>. O aumento da liberação de NO pode ser mensurado, em certas circunstâncias, em culturas celulares após a LILT. É proposto na literatura, que a irradiação pode promover a foto-dissociação de NO e citocromo-c oxidase, com reversão da inibição do processo respiratório nas células<sup>14</sup>. Este coeficiente positivo de geração de trifosfato de adenosina (ATP), como consequência da ação da LILT, é aceito na literatura como a principal contribuição para chegar aos efeitos biológicos observados após a irradiação<sup>9, 11, 14-17</sup>.

Levando-se em consideração que a ação da LILT pode induzir aumento na proliferação celular, é plausível esperar que esta terapia pudesse agir sobre o crescimento de células microbianas presentes em um processo infeccioso. Apesar de este aumento da proliferação bacteriana *in vitro* ter sido previamente demonstrado<sup>18</sup>, estudos *in vivo* indicam que a LILT é capaz de fechar mais rápido uma lesão infectada<sup>19, 20</sup>. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da irradiação laser em baixa intensidade sobre um processo infeccioso induzido por *Pseudomonas aeruginosa* em pata de camundongos.

## METODOLOGIA

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi cultivada em placa de Petri contendo meio de cultura *tryptic soy agar* (TSA). As células foram retiradas de um estoque congelado a -80°C, gentilmente semeadas sobre a superfície do ágar e levadas para incubação em atmosfera de ar a 37°C, onde permaneceram por 24h. Decorrido o tempo de crescimento, uma amostra da massa de bactérias foi removida do ágar, com auxílio de uma alça flexível estéril, e suspensa em solução salina fosfatada tamponada (PBS). A transmissão  $70 \pm 2\%$  foi ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda ( $\lambda=600\text{nm}$ ) para formação de um inóculo com aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

Dezesseis camundongos machos BALB/c, adultos, com massa corpórea de aproximadamente 25 g foram utilizados neste estudo e, mantidos no biotério do IPEN-CNEN/SP. Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA) desta instituição e, durante todo o experimento os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12 h com água e ração granulada *ad libitum*.

Os camundongos foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (0,8 mL/Kg) e xilazina (0,2 mL/Kg) por via intraperitoneal. Após anestesia, eles foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo laser (GL). Nos dois grupos, a pata esquerda de cada animal foi inoculada com 50  $\mu\text{L}$  da suspensão contendo aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC de *P. aeruginosa*, enquanto a pata direita recebeu o mesmo volume de PBS.

Seis horas após a inoculação, a pata esquerda dos animais do GL (n=8) foi irradiada com um laser diodo (PhotoLase III, DMC, São Carlos, Brasil) emitindo em  $\lambda=660\text{ nm}$ , com potência ajustada em P=50 mW e tempo de irradiação de 18s. A irradiação foi feita uma única vez em uma área de 0,3 cm<sup>2</sup> e foi entregue uma fluência de 3 J/cm<sup>2</sup>. O grupo controle (n=8) não recebeu qualquer tratamento.

Os animais foram posicionados individualmente para realização de fotografias digitais padronizadas de suas patas. As fotografias foram tomadas imediatamente após o tratamento (momento 0), e também 16 h e 24 h após a irradiação. Veja o cronograma do experimento na figura 1.

As imagens obtidas foram analisadas utilizando o *software* ImageJ. Os dados foram avaliados utilizando teste t *Student* com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Após a inoculação de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de bactérias, foi observado um aumento no volume das patas. Esta alteração de volume foi idêntica ao observado na pata direita, que recebeu o mesmo volume de PBS. Decorridos 40 min da inoculação, o líquido injetado não produzia mais alterações visíveis no volume das patas direitas e esquerdas, que apresentavam as mesmas características de antes da inoculação.

De 4 a 5 h após a inoculação, as patas esquerdas dos camundongos apresentavam um início de edema, e no momento de 6 h após inoculação todos os camundongos apresentavam um edema exacerbado nesta mesma pata, quando comparado à pata direita que se mantinha sem alterações morfológicas visíveis. Observe a figura 2A e 2D, onde são apresentadas as características do edema induzido por inoculação de *P. aeruginosa* na pata esquerda.

Os valores médios de edema na pata esquerda dos camundongos são apresentados na figura 3. Pode ser observado que no grupo controle, uma tendência de aumento no edema acontece no momento de 16 h; após 24 h foi observado uma tendência de diminuição deste edema. É importante ressaltar que não foram observadas diferenças estatísticas no tamanho do edema entre os momentos experimentais do grupo controle (GC). Por outro lado, no grupo laser (GL) são

observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) 16 h e 24 h após a irradiação quando comparados ao momento do tratamento. Isso indica uma clara diminuição no edema diretamente relacionado ao efeito da irradiação.

Na comparação entre os grupos GC e GL, destaca-se o comportamento do edema no momento 16 h. Enquanto uma tendência de aumento é observada no GC, uma significativa diminuição acontece no GL, e estes dois grupos apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ( $p = 0,02$ ). Nos demais momentos, não existem diferenças significativas entre os dois grupos, ou seja, os momentos iniciais são iguais, bem como o momento 24 h.

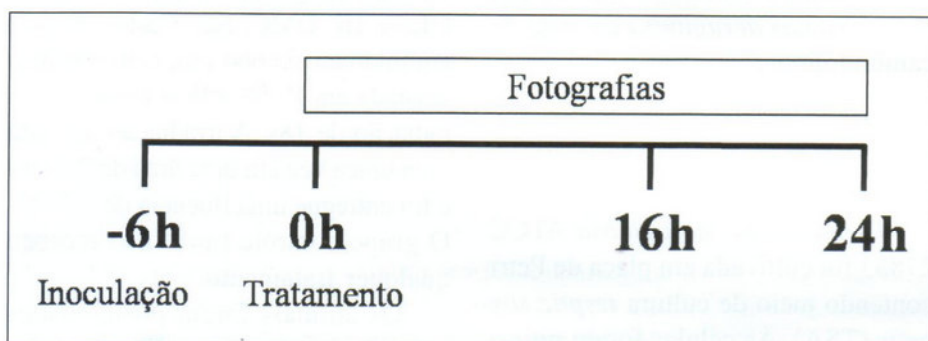


Figura 1 - Cronograma do experimento.

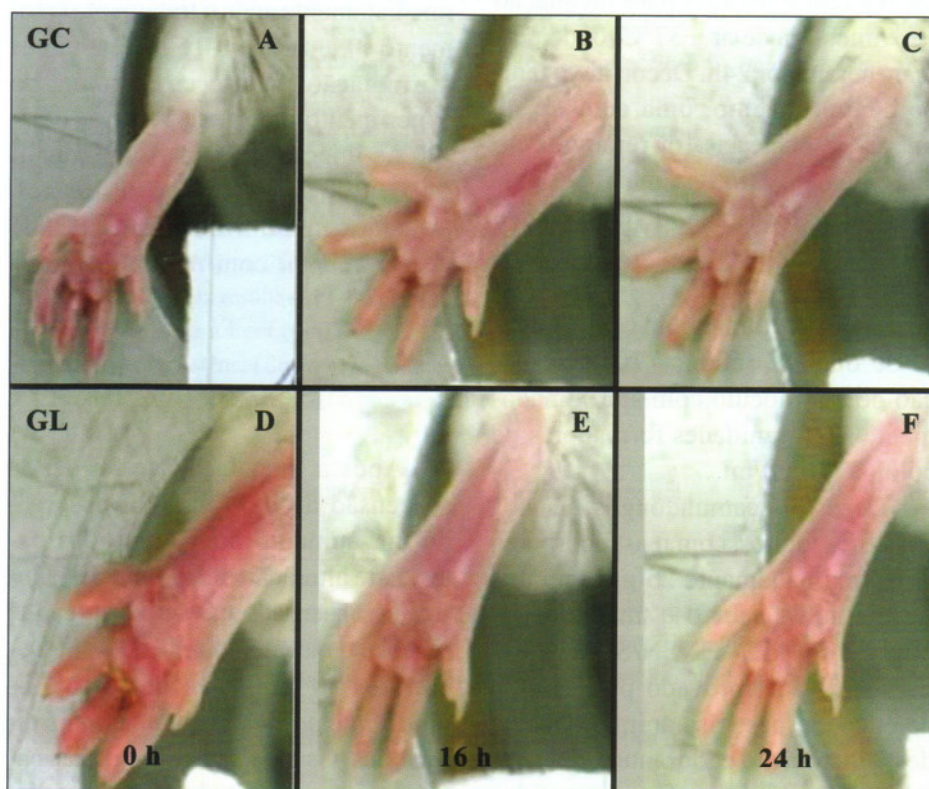


Figura 2 - Fotografia do edema na pata esquerda de camundongos dos grupos observados (GC ou GL) nos momentos 0, 16 e 24 h após o tratamento. As letras indicam: A) GC 0 h, B) GC 16 h, C) GC 24 h, D) GL 0 h, E) GL 16 h, F) GL 24 h.

## DISCUSSÃO

Os benefícios da LILT sobre o processo de regeneração tecidual têm sido amplamente relatados em vários trabalhos experimentais<sup>2,4,6,9,10,19</sup>. Apesar dos inúmeros relatos positivos da LILT na clínica médica, autores divergem quanto a sua aplicação diante de processo infeccioso ativo, sendo este, uma contra-indicação embora de maneira conservadora.

Nossos resultados indicam que a LILT apresentou efeitos positivos sobre o processo infeccioso induzido por *P. aeruginosa* em pata de camundongos, visto que, para o grupo tratado, houve redução significativa no edema, o que indicou uma redução do processo inflamatório agudo. Ferreira e colaboradores<sup>19,20</sup> analisaram o processo de cicatrização em modelo experimental de paracoccidiodomicose e demonstraram que a LILT também foi eficaz em minimizar os efeitos locais observados no quadro de paracoccidiodomicose.

Trabalhos realizados *in vitro* têm mostrado que os efeitos da LILT na proliferação celular dependem dos parâmetros de irradiação e do tipo de

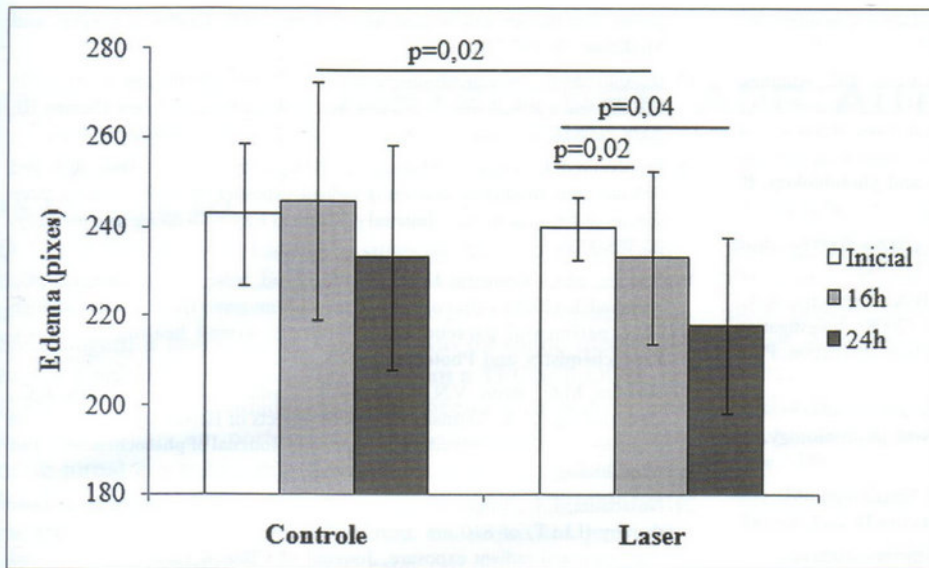


Figura 3 - Média e desvio padrão dos valores de edema na pata posterior esquerda.  $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

microrganismo irradiado. Karu e colaboradores<sup>12</sup> ao analisarem os efeitos da irradiação com laser e luz incoerente no crescimento *in vitro* de *Escherichia coli* demonstraram o efeito estimulante no crescimento dessa bactéria. Posteriormente, Nussbaum e colaboradores<sup>21</sup> ao analisarem *in vitro* os efeitos da LILT ( $\lambda=810$  nm) no crescimento bacteriano demonstraram que os efeitos da fotoestimulação dependem da espécie do microorganismo utilizado e da fluência empregada.

Alguns autores sugerem que a irradiação com laser de baixa intensidade no processo infeccioso ativo pode aumentar o metabolismo do microorganismo causador do quadro infec-

cioso. No entanto, deve se levar em consideração que após a luz ser absorvida pelo tecido, ocorre também espalhamento e transmissão desta luz para as áreas em torno do sítio infectado. Ihsan<sup>22</sup> analisou a eficácia da LILT na circulação colateral e micro-circulação quando um vaso sanguíneo é obstruído. Os animais receberam uma irradiação ( $\lambda=904$  nm,  $P=10$  mW,  $t=10$  min) diariamente durante três dias consecutivos, e como resultado, foi observado um rápido aumento do diâmetro capilar 4-12 h após a irradiação, que persistiu até o final do experimento no grupo tratado. Tal resultado pode explicar o controle do processo infeccioso, pois um aumento do diâmetro

dos capilares facilitaria a migração dos macrófagos ao sítio infectado.

Os mecanismos envolvidos na redução do edema observado em nossos resultados podem estar associados à liberação do hormônio corticosteróide, redução dos níveis de prostaglandinas, melhora do fluxo sanguíneo local, que leva a modulação da resposta imunológica<sup>8</sup>. Os efeitos de diferentes protocolos e doses de luz foram estudados utilizando-se um edema induzido por carragenina. Os autores relataram que os efeitos anti-inflamatórios da LILT estão relacionados a liberação de corticosteróide pela glândula adrenal e ativação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal<sup>8</sup>.

Novoselova e colaboradores<sup>23</sup> verificaram os efeitos biomoduladores da LILT sobre o sistema imunológico. Ao irradiarem pele de ratos com laser He-Ne, eles relataram que os efeitos biomoduladores da LILT sobre o sistema imunológico dependem da somatória de doses e da localização anatômica da superfície irradiada.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a fototerapia com laser em baixa intensidade, nas condições utilizadas neste estudo, não aumenta infecção bacteriana e pode reduzir edema em processo infeccioso agudo.

## REFERÊNCIAS

- Ribeiro, M.S., Silva, D.F.T.d., De Araujo, C.E., De Oliveira, S.F., Pelegrini, C.M., Zorn, T.M., Zzell, D.M. (2004). Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 22,59-66.
- Amorim, J.C.F., Sousa, G.R., Silveira Lde, B., Prates, R.A., Pinotti, M., Ribeiro, M.S. (2006). Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 24,588-594.
- Demidova-Rice, T.N., Salomatina, E.V., Yaroslavsky, A.N., Herman, I.M., Hamblin, M.R. (2007). Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers in Surgery and Medicine*. 39,706-715.
- Franca, C.M., Nunez, S.C., Prates, R.A., Noborikawa, E., Faria, M.R., Ribeiro, M.S. (2009). Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 94,25-31.
- Moreira, M.S., Velasco, I.T., Ferreira, L.S., Ariga, S.K., Barbeiro, D.F., Meneguzzo, D.T., Abatepaulo, F., Marques, M.M. (2009). Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 97,145-151.
- Castano, A.P., Dai, T., Yaroslavsky, I., Cohen, R., Apruzzese, W.A., Smotrich, M.H., Hamblin, M.R. (2007). Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers in Surgery and Medicine*. 39,543-550.
- Martins, R.A.B.L., Marcos, R.L., Ramos, L., Pallota, R.C., Penna, S.C., Bjordal, J.M. (2007). Novos Paradigmas No Processo Inflamatório: Possíveis

- Mecanismos de Ação da Laserterapia de Baixa Intensidade e Considerações Sobre Dosimetria. **Jornal Brasileiro de Laser**. 1,12-18.
8. Albertini, R., Aimbire, F.S., Correa, F.I., Ribeiro, W., Cogo, J.C., Antunes, E., Teixeira, S.A., De Nucci, G., Castro-Faria-Neto, H.C., Zangaro, R.A., Lopes-Martins, R.A. (2004). Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**. 74,101-107.
  9. Huang, Y.Y., Chen, A.C., Carroll, J.D., Hamblin, M.R. (2009). Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**. 7,358-383.
  10. Silveira, L.B., Prates, R.A., Novelli, M.D., Marigo, H.A., Garrocho, A.A., Amorim, J.C., Sousa, G.R., Pinotti, M., Ribeiro, M.S. (2008). Investigation of mast cells in human gingiva following low-intensity laser irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**. 26,315-321.
  11. Karu, T. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**. 49,1-17.
  12. Karu, T., Tiphlova, O., Letokhov, V., Lobko, V. (1983). Stimulation of E. coli growth by laser and incoherent red light. **Il Nuovo Cimento D**. 2,1138-1144.
  13. Brown, G.C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1504,46-57.
  14. Lane, N. (2006). Cell biology: power games. **Nature**. 443,901-903.
  15. Karu, T., Tiphlova, O., Esenaliev, R., Letokhov, V. (1994). Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on Escherichia coli. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**. 24,155-161.
  16. Karu, T.I., Pyatibrat, L.V., Afanasyeva, N.I. (2005). Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**. 36,307-314.
  17. Hamblin, M.R. The role of nitric oxide in low level light therapy. In: Hamblin MR, Waynant RW, Anders J, editors. Mechanisms for Low-Light Therapy III: 2008 2008/02/07; San Jose, CA, USA: SPIE; 2008. p. 684602-684614.
  18. Nussbaum, E.L., Lilge, L., Mazzulli, T. (2002). Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm<sup>2</sup> on three species of bacteria in vitro. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. 20,325-333.
  19. Ferreira, M.C., Gameiro, J., Nagib, P.R., Brito, V.N., Vasconcelos Eda, C., Verinaud, L. (2009). Effect of low intensity helium-neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. **Photochemistry and Photobiology**. 85,227-233.
  20. Ferreira, M.C., Brito, V.N., Gameiro, J., Costa, M.R., Vasconcelos, E.C., Cruz-Hofling, M.A., Verinaud, L. (2006). Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**. 84,141-149.
  21. Nussbaum, E.L., Lilge, L., Mazzulli, T. (2003). Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. 21,283-290.
  22. Ihsan, F.R. (2005). Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. **Photomedicine and Laser Surgery**. 23,289-294.
  23. Novoselova, E.G., Glushkova, O.V., Cherenkov, D.A., Chudnovsky, V.M., Fesenko, E.E. (2006). Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. 22,33-38.

# JORNAL BRASILEIRO DE LASER

