

# Comparação do efeito da terapia laser de baixa potência e irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade *in vitro*

## *Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro*

Deise A. A. Pires Oliveira<sup>1</sup>, Rodrigo Franco de Oliveira<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Doutores do Laboratório de Dinâmica de Compartimento Celular, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D – Univap/São José dos Campos.

### Endereço para correspondência:

Deise A. A. Pires Oliveira  
Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova  
12244-000 – São José dos Campos – São Paulo [Brasil]  
e-mail: deisepyres@yahoo.com.br

### Resumo

Vários métodos, como laser e ultra-som, são utilizados para processos de cicatrização e reparo tecidual. O objetivo foi comparar o efeito da terapia a laser e ultra-som em cultura celular de fibroblastos. As culturas irradiadas com laser foram divididas em três grupos: I- controle; II- 6 J/cm<sup>2</sup>, e III- 50 mJ/cm<sup>2</sup>, as irradiadas com ultra-som, divididas em cinco grupos: 1- controle; 2- 0,2 W/cm<sup>2</sup>, no modo pulsado a 10% (1:9 ciclo); 3- 0,6 W/cm<sup>2</sup>, a 10% (1:9 ciclo); 4- 0,2 W/cm<sup>2</sup>, a 20% (2:8 ciclo), e 5- 0,6 W/cm<sup>2</sup>, a 20% (2 : 8 ciclo). Cada grupo foi irradiado com intervalos de 24 horas de incubação pós-irradiação (24, 48 e 72 horas). Depois de cada irradiação, as culturas foram analisadas por meio do teste de citotoxicidade MTT. A análise dos resultados demonstrou que o efeito do laser em cultura celular foi maior que o ultra-som ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que o laser aumentou significativamente a atividade fibroblástica em relação ao ultra-som. Assim, na primeira e segunda fases da reparação tecidual, o tratamento a laser pode ser mais eficaz que com ultra-som.

**Descritores:** Cultura celular; Fibroblasto; Laser; Reparação; Ultra-som.

### Abstract

Several methods, ultrasound and laser, are used to tissue repair and healing processes. The objective was to compare the effect of laser (LLLT) and ultrasound (LIPUS) on fibroblast cell culture. Cultures irradiated with laser energy were divided into three groups: I- control; II- 6 J/cm<sup>2</sup>; and group III: 50 mJ/cm<sup>2</sup>. Cultures irradiated with ultrasound were divided into five groups: 1- control; 2- 0.2 W/cm<sup>2</sup> in pulsed mode at 10% (1:9 duty cycle); 3- 0.6 W/cm<sup>2</sup> in pulsed mode at 10% (1:9 duty cycle); 4- 0.2 W/cm<sup>2</sup> in pulsed mode at 20% (2:8 duty cycle); and 5- 0.6 W/cm<sup>2</sup> in pulsed mode at 20% (2:8 duty cycle). Each group was irradiated at 24 h intervals, with the following post-irradiation incubation periods: 24, 48, and 72 h; after each irradiation cycle the cultures were analyzed using MTT cytotoxicity test. Analysis of results demonstrated that the effect of laser therapy on fibroblast cell culture was greater than that of LIPUS ( $p < 0.05$ ). Results showed that LLLT significantly increased fibroblastic activity more than LIPUS. Therefore, in the first and second phases of tissue repair, laser treatment may be more effective than ultrasound.

**Key words:** Cell culture; Fibroblast; Low-level laser therapy; Repair; Ultrasound.

## Introdução

Nos tecidos vivos, quando ocorre um traumatismo tecidual, há o desencadeamento de um complexo conjunto de eventos vasculares, celulares e bioquímicos que objetivam substituir células mortas ou imperfeitas por células saudáveis, estabelecendo um processo de reconstrução tecidual chamado de reparação<sup>1</sup>. Thomaz et al.<sup>2</sup> definem essa reparação como substituição das células atingidas por outras do mesmo tipo e com a mesma função, provenientes da proliferação de elementos parenquimatosos ainda visíveis do foco da lesão, podendo resultar em restituição quase perfeita da estrutura normal.

O reparo tecidual é processo de regeneração observado em uma variedade de tecidos biológicos, sendo considerado um dos mecanismos primários de sobrevivência<sup>3</sup>. Ressaltamos a importância dos fibroblastos, por produzirem o colágeno que é responsável pela força e integridade do tecido, apresentando papel importante no processo cicatricial<sup>4</sup>.

Recentemente, alguns métodos físicos, incluindo tratamento por ultra-som e terapia com laser de baixa potência, estão sendo utilizados para obter eficácia no processo de cicatrização. Estudos sobre o processo de reparação e cicatrização, em que se discute a eficácia de tratamentos por esses métodos terapêuticos<sup>5, 6</sup>, têm sido reportados por vários autores.

A terapia ultra-sônica pulsada de baixa intensidade apresenta respostas clínicas significativas sobre as células e tecidos, tais como favorecimento da degranulação de células de sustentação, alteração da função da membrana celular, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que estimulam a atividade fibroblástica, aumento da síntese protéica, angiogênese, permeabilidade vascular e degranulação celular na fase aguda da lesão. Nesse tipo de terapia, os fibroblastos seriam estimulados a sintetizar uma maior quantidade de colágeno, favorecendo a formação de um tecido cicatricial mais forte<sup>7</sup>.

Outra forma de tratamento é a terapia com laser de baixa potência que, por sua vez, estimu-

la a formação óssea pelo aumento da atividade osteoblástica, da vascularização, de organização das fibras colágenas e dos níveis de ATP<sup>6</sup>. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que tratar com laser acelera as reações bioquímicas, a ativação de fibroblastos, a síntese de colágeno, a neovascularização, além de aumentar a atividade fagocítica de leucócitos<sup>5</sup>.

O objetivo, neste estudo, foi comparar o efeito da terapia a laser de baixa potência e o da ultra-sônica pulsada de baixa intensidade em cultura celular fibroblástica.

## Materiais e métodos

### Cultura Celular

Células L929 de fibroblastos (Mouse conjunctive tissue – ATCC CCL-1 NCTC)(Instituto Adolfo Lutz – SP, Brasil) foram rotineiramente cultivadas em placas de 25-cm<sup>2</sup> (TPP, Switzerland, Europe) com MEM (Minimum Essencial Medium) (Gibco™ – Invitrogen Corporation, Grand Island, USA) suplementado com 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Cultilab, Brazil) e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, em atmosfera 5%, a 37° C. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da UNIVAP, sob protocolo n° A061/CEP/2006. Células de tecido conjuntivo de rato foram utilizadas neste experimento, conforme recomendação de utilização para testes de toxicidade *in vitro* que constam na ISO 10993-5. Foram utilizados equipamentos descritos na sequência.

### Ultra-Som

Ultra-Som KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, modelo Avatar III, com 1 cabeçote de um 1MHz, com Área de Radiação Efetiva (ERA) de 1 cm<sup>2</sup>, devidamente calibrado pelo fabricante.

### Laser

Laser AsGa  $\lambda=904$  nm Endophoton – KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda,

modelo LLTO 0107, devidamente calibrado pelo fabricante.

## Irradiação

Para realizar a irradiação ultra-sônica, as culturas de células L929 foram subcultivadas em 3 placas TPP de 12 poços, numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, e separados os seguintes grupos: 1- controle (não recebeu irradiação); 2- 0,2 W/cm<sup>2</sup>, no modo pulsado a 10% (1:9 ciclo); 3- 0,6 W/cm<sup>2</sup>, a 10% (1:9 ciclo); 4- 0,2 W/cm<sup>2</sup>, a 20% (2:8 ciclo), e 5- 0,6 W/cm<sup>2</sup>, a 20% (2:8 ciclo). Para um bom acoplamento da interface do ultra-som (distância transdutor – camada de células: de 18 mm) e propagação da onda mecânica, os volumes dos poços foram completados com meio MEM até a borda, e o poço irradiado, mantido sempre na mesma posição em relação à face do transdutor do ultra-som. Realizou-se a aplicação, por 2 minutos, em cada poço, em temperatura ambiente, sendo descartado o aquecimento da placa.

Para irradiação a *laser*, as células foram subcultivadas em 3 placas TPP de 96 poços, numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, separados os seguintes grupos: I, controle (que não recebeu irradiação); II, 6 J/cm<sup>2</sup>, e III, 50 mJ/cm<sup>2</sup>. A energia *laser* foi entregue à cultura, em emissão pulsátil por uma fibra óptica de 0,01cm<sup>2</sup> de área, método de aplicação pontual, com a caneta *laser* perpendicularmente (90°), em contato direto com a placa. Realizou-se aplicação, por 36 segundos, em cada ponto e dividiu-se a área do poço em 2 pontos para o grupo II; 2 segundos em cada ponto, para o III, em temperatura ambiente, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Após cada período, as culturas foram avaliadas pelo teste de citotoxicidade celular por MTT.

## Teste de citotoxicidade celular por MTT

Os experimentos de citotoxicidade foram avaliados pelo método de MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide. As culturas receberam irradiação ultra-sônica e

*laser* nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, de acordo com ensaio a seguir:

**Ultra-Som** – depois de retirado o meio MEM, cada poço recebeu 80 µl de MTT, uma concentração final de 0,5 mg/mL e foram incubados por 1 hora a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>; em seguida, adicionaram-se 400 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) em cada poço. A placa foi mantida, por 30 minutos, em agitação para a solubilização dos cristais de formazana, e sua concentração, quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – SpectraCount – Packard Instrument, USA) em comprimento de onda de 570nm.

**Laser** – cada poço recebeu 20 µl MTT, uma concentração final de 0,5 mg/mL, e foi incubado por 1 hora, a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>; em seguida, adicionaram-se 100 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) em cada um deles. A placa foi mantida, por 30 minutos, em agitação para solubilização dos cristais de formazana, e sua concentração, quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – SpectraCount – Packard Instrument, USA) em comprimento de onda de 570nm.

## Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores médios ±. Para comparações e verificação de diferenças expressivas entre os grupos, utilizaram-se a Análise de Variância (ANOVA) e teste *post hoc* Tukey HSD. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Na análise estatística, utilizou-se o programa Graphpad Prism, versão 4.0 (San Diego, Ca USA).

## Resultados e discussão

Na análise dos resultados, após terapia a *laser* de baixa potência e irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade a 10% (1:9 ciclo de

trabalho), demonstrou-se que o efeito da terapia a laser na cultura celular fibroblástica foi superior ao da irradiação por ultra-som. Apesar de existirem diferenças significantes entre as células não-irradiadas e irradiadas por ultra-som, a terapia a laser demonstrou um maior efeito na taxa de crescimento celular tanto no grupo II (6 J/cm<sup>2</sup>) quanto no III (50 mJ/cm<sup>2</sup>), tendo maior crescimento no grupo III (50 mJ/cm<sup>2</sup>), quando comparado com o II (6 J/cm<sup>2</sup>). Observou-se que esse comportamento ocorreu em todas as fases temporais analisadas, havendo crescimento significativo entre 24 e 48 horas (Figura 1).

Na terapia a laser de baixa potência e na irradiação ultra-sônica pulsada a 20% (2:8 ciclo de trabalho) de baixa intensidade, verifica-se o mesmo comportamento, tal como apresentado pelo grupo de células irradiadas em modo pulsado a 10% (1:9 ciclo de trabalho). Entretanto, cabe salientar que o comportamento encontrado neste experimento foi maior em relação às células irradiadas por ultra-som pulsado a 20% (2:8 ciclo de trabalho), em decréscimo a partir das 48 horas após a primeira irradiação.

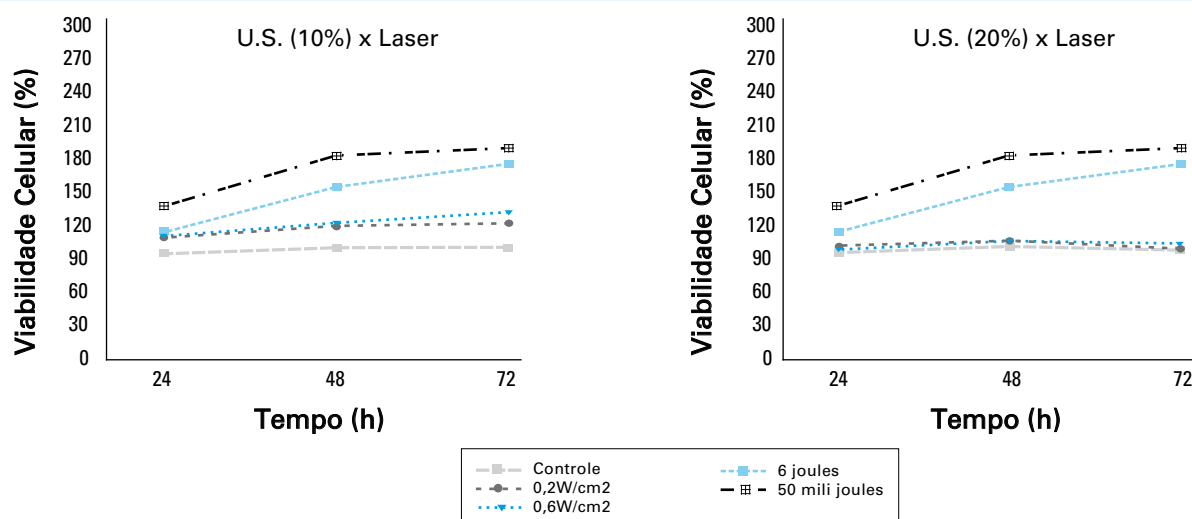
Os dados obtidos demonstraram que o tratamento com terapia a laser de baixa potência foi mais efetivo, sendo mais significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado com o realizado com ultra-

som, corroborando os resultados descritos por Demir et al.<sup>5</sup>.

Vários estudos focalizam a aceleração da fase de reparo e a melhora da qualidade e resistência na contração da cicatriz, sendo enfatizada a eficácia de alguns métodos físicos, incluindo ultra-som pulsado de baixa intensidade e laser de baixa potência, cujos resultados foram significativos *in vivo*<sup>8,9,10,11</sup>. Entretanto, não há estudos conclusivos na literatura, no que diz respeito aos efeitos comparativos do laser de baixa potência e ultra-som em cultura celular.

Segundo Steven et al.<sup>12</sup>, culturas humanas de fibroblastos expostas a ondas ultra-sônicas, a partir de 0,5 W/cm<sup>2</sup>, demonstraram maior síntese de proteína. Esses resultados sugerem a correlação entre produção de proteína, formação de colágeno e maior resistência do tecido. A terapia com laser de baixa potência promoveu maior vascularização em fraturas de tíbias de ratos, em adição com fibroplasia, remodelagem óssea, neovascularização de vasos e aumento de fibras de colágenos.

O ultra-som tem sido bastante efetivo na estimulação de fibroblasto. Em alguns estudos, os pesquisadores concluíram que a intensidade de ultra-som de 0,1 W/cm<sup>2</sup> a 0,5 W/cm<sup>2</sup> acelera a fase inflamatória do reparo<sup>13, 14, 15</sup>. Em outros estudos, demonstrou-se que culturas celulares L929 submetidas a ultra-som (0,2 e 0,6 W/cm<sup>2</sup>) mantêm a



**Figura 1:** Valores obtidos na análise das médias de três experimentos de viabilidade celular mediante aplicação de laser de baixa potência e ultra-som em modo pulsado a 10% e 20%.

**Tabela 1:** Valores de significância obtidos na análise de variância entre as médias de três experimentos de cultura de células por meio do teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey test HSD, para células irradiadas pelo *laser* e ultra-som em modo pulsado a 10%

Modo Pulsado (10%)							
Tempo (h)	Controle vs. 6J	Controle vs. 50mJ	6J vs. 0,6 W/cm <sup>2</sup>	6J vs. 0,2 W/cm <sup>2</sup>	50mJ vs. 0,6 W/cm <sup>2</sup>	50mJ vs. 0,2 W/cm <sup>2</sup>	6J vs. 50mJ
24	0,001***	0,001***	0,04***	0,035***	0,001***	0,001***	0,01***
48	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,01***
72	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,02***

Nota: W/cm<sup>2</sup> – Watts por centímetro quadrado; J – joule; mJ – mile joule.

**Tabela 2:** Valores de significância obtidos na análise de variância entre as médias de três experimentos de cultura de células por meio do teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey test HSD, para células irradiadas pelo *laser* e ultra-som em modo pulsado a 20%

Modo Pulsado (20%)							
Tempo (h)	Controle vs. 6J	Controle vs. 50mJ	6J vs. 0,6 W/cm <sup>2</sup>	6J vs. 0,2 W/cm <sup>2</sup>	50mJ vs. 0,6 W/cm <sup>2</sup>	50mJ vs. 0,2 W/cm <sup>2</sup>	6J vs. 50mJ
24	0,001***	0,001***	0,01***	0,01***	0,001***	0,001***	0,01***
48	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,01***
72	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,001***	0,023***

Nota: W/cm<sup>2</sup> – Watts por centímetro quadrado; J – joule; mJ – mile joule.

forma e a integridade celular<sup>16</sup>. Karnes et al.<sup>17</sup>, em estudos utilizando ultra-som, observaram que a duração da fase inflamatória diminuiu e a proliferativa foi afetada positivamente pelo aumento do nível de hidroxiprolina e número de fibroblasto, assim como estimulação da síntese de colágeno.

Segundo Rizzi et al.<sup>18</sup>, a fotoestimulação pelo *laser* de baixa potência pode promover produção de matriz extracelular, aumento da produção de colágeno e, conseqüentemente, maior resistência na contração da cicatriz.

Estudos *in vivo* e *in vitro* com tratamento a *laser* mostraram aceleração das reações químicas, atividade fibroblástica, metabolismo de colágeno, neovascularização, qualidade da ferida e formação da cicatriz<sup>8,19</sup>.

Outro importante resultado da terapia a *laser* está relacionado com o efeito antibacteriano, porque inibe a proliferação de bactérias em culturas celulares<sup>20</sup>.

De acordo com Demir et al.<sup>5</sup>, comparadas as 2 modalidades em relação à fase inflamatória do reparo, o tratamento a *laser* foi mais efetivo, demonstrando resultados significativos em rela-

ção ao realizado com ultra-som, por apresentar diminuição do número de macrófagos e diminuição da fase de inflamação.

## Conclusão

Os resultados demonstrados neste trabalho confirmam que estudos comparativos da terapia a *laser* de baixa potência com a do ultra-som pulsado de baixa intensidade apresentam efeitos significativos na radiação de fibroblastos em cultivo. Com a terapia a *laser* de baixa potência, verificou-se que houve aumento expressivo da atividade fibroblástica em relação à radiação ultra-sônica, considerando-se os parâmetros utilizados. Portanto, concluiu-se que o tratamento com *laser* pode ser mais efetivo que o realizado com ultra-som na primeira e segunda fases de reparo tecidual.

Novos estudos são necessários para determinar melhores parâmetros – especificamente doses e períodos de aplicação – para o tratamento com terapia a *laser* de baixa potência e radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade,

no processo de cicatrização e reparo tecidual em cultura celular.

## Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), à KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda – Brasil e a Nelson Fuirini Junior, por apoiar este estudo.

## Referências

- Gonçalves G, Parizotto NA, Fisiopatologia da regeneração cutânea: atuação da fisioterapia. *Rev Bras Fisiot.* 1998;(3):5-13.
- Thomaz JB, Herdy CDC, Oliveira JCP. Fundamentos da cicatrização das feridas. *Arq Bras Med.* 1996;70(2):65-72.
- Lizarelli RFZ, Lamano CTL. Histometrical evolution of the healing of the dental alveolus in rats after irradiation on with a low-powered GaAlAs laser. *Lasers Dent.* 1999;3543:4956.
- Hawkins DH, Abrahamse H, The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38:74-83.
- Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004;41(5):721-8.
- Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):735-40.
- Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987;73(3):116-20.
- Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparasion of the effects of electrical stimulation and laser treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004;41(2):147-54.
- Takan I, Ozyazgan I, Tercan M, Karda HY, Balkanl S, Saraymen R, et al. A Comparasion study of the effects of ultrasound and electrostimulation on wound healing in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:966-72.
- Tatarchuk PA, The application of perilesional bioelectrical stimulation in mechanical treatment of wounds. *Klin Khir.* 2000;1:33-5.
- Houghton PE, Kincaid CD, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Woodbury MG, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys Ther.* 2003;83:17-28.
- Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil.* 1997;76:288-96.
- Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the breaking of full-thicking excised skin lesions. *Ultrasonics.* 1990;28:170-80.
- Taskan I, Ozyazgan I, Tercan M, Kardas HY, Balkanli S, Saraymen R, Zorlu U, Ozugul Y. A comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on wound healing in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(4):966-72.
- El-Batouty MF, El-Gindy M, El-Shawaf I, Bassioni N, El-Ghaweet A, El-Eman A. Comparative evaluation of the effects of ultrasonic and ultraviolet irradiation on tissue regeneration. *Scand J Rheumatol.* 1986;15:381-6.
- Hsieh Yueh-Ling. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Phys Ther.* 2006;86:39-49.
- Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83:1-4.
- Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González-Gallego J. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704-13.
- Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, Naim JO. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med.* 2001;28(3):220-6.
- Cummings J. Role of light in wound healing. In: Kloth LC, McCulloch JM, Feedaar JA. Editors. *Wound healing: Alternatives in management.* Philadelphia (PA): FA Davis Co; 1990. p. 287-294.