

# Efeitos do laser de baixa intensidade em cultura bacteriana *in vitro* e ferida infectada *in vivo*

## *Effects of low intensity laser in in vitro bacterial culture and in vivo infected wounds*

PÂMELA ROSA PEREIRA<sup>1</sup>; JOSUE BRUGINSKI DE PAULA<sup>2</sup>; JULIETTE CIELINSKI<sup>3</sup>; MARCELO PILONETTO<sup>3</sup>; LUIZ CARLOS VON BAHTEN, TCBC-PR<sup>2</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** comparar os efeitos da terapia a laser de baixa intensidade no crescimento bacteriano *in vitro* e em feridas infectadas *in vivo*, e analisar a efetividade da tecnologia Laser AsGa, em feridas infectadas *in vivo*. **Métodos:** *in vitro*: cepas de *Staphylococcus aureus* foram incubadas em placas de agar-sangue e irradiadas com laser de 904nm de comprimento de onda e dose de 3J/cm<sup>2</sup>, diariamente durante sete dias. *In vivo*: 32 ratos machos Wistar foram distribuídos em Grupo Controle (Não Infectado) e Grupo Experimental (Infectados). Metade dos ratos tiveram suas feridas irradiadas e a outra metade não irradiada, como realizado no estudo *in vitro*. **Resultados:** *in vitro*: não houve variação estatística significativa entre os grupos experimentais, considerando as placas matrizes e derivadas ( $p > 0,05$ ). *In vivo*: houve aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e III na cicatriz do grupo dos animais infectados e irradiados, quando avaliados no quarto dia de experimento ( $p = 0,034$ ). **Conclusão:** a *Low-Intensity Laser Therapy* aplicada com comprimento de onda de 904nm e dose de 3J/cm<sup>2</sup>, *in vitro*: não alterou o crescimento de *S. aureus* nos grupos experimentais. *In vivo*: mostrou aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e III na cicatriz no grupo dos animais infectados e irradiados no quarto dia de experimento.

**Descritores:** Infecção. Terapia a laser. Terapia a laser de baixa intensidade. Cicatrização. *In vitro*.

### INTRODUÇÃO

A terapia a laser é um tratamento não invasivo que apresenta registros na literatura indicando efeitos e aplicações variadas na prática clínica, incluindo efeitos sobre cada uma das fases da cicatrização tecidual<sup>1-7</sup>.

A aplicação do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização de feridas parece ser interessante e promissor; entretanto, seu uso no manejo de extensas lesões de tecidos moles com imputada contaminação bacteriana não foi, ainda, objeto de investigação adequada.

A influência do laser de baixa intensidade sobre a modulação fenotípica de diferentes populações bacterianas tem sido pobremente discutida na literatura. Como a infecção é uma causa comum de atraso na cicatrização de feridas, é importante compreender o efeito da terapia a laser de baixa intensidade no crescimento bacteriano<sup>8</sup>.

A literatura é controversa no que diz respeito aos efeitos da *Low-Intensity Laser Therapy* (LLLT) sobre o crescimento bacteriano. Em alguns países essa terapia ainda é vista com certo ceticismo, decorrente da publicação de trabalhos controversos na literatura, mostrando tanto

efeitos benéficos, como nenhum efeito da terapia com laser em baixa intensidade<sup>9-12</sup>.

É muito comum, também, que a investigação falhe em demonstrar um efeito particular por causa da existência de ensaios pouco controlados, na sua maioria *in vitro*, com escolha de parâmetros incorretos e casuística relativamente pequena<sup>13-17</sup>.

Diante desse cenário e da falta de estudos que analisem a efetividade da terapia a laser de baixa intensidade em feridas infectadas, justifica-se a continuidade de pesquisas nesta área.

Os objetivos deste trabalho consistem em comparar os efeitos da terapia a laser de baixa intensidade no crescimento bacteriano *in vitro* e em feridas infectadas *in vivo*, e analisar a efetividade da tecnologia Laser AsGa (arseneto de gálio) sobre a cicatrização e infecção, em feridas infectadas *in vivo*.

### MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob o registro nº 509.

1. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil; 2. Departamento de Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil. Mentor; 3. Departamento de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil.

O uso dos animais seguiu o código de ética do Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas para experimentação animal e os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a legislação nacional em vigor sobre os procedimentos para uso de animais experimentais (Lei Federal 11.794, de 09 de outubro de 2008).

### Bactéria

A bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foi escolhida por ser comumente associada à infecções de feridas e por ser a bactéria gram-positiva mais comum em infecção de feridas, além de ser a espécie mais virulenta do seu gênero.

A preparação para o experimento *in vitro* e *in vivo* foi iniciada com a ativação da bactéria, utilizando uma cepa padrão de *S. aureus* derivada do ATCC 25923. A bactéria cultivada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) foi mantida viva através de uma diluição seriada da bactéria e foi utilizada para fazer uma suspensão da bactéria equivalente a  $10^{-2}$  unidades formadoras de colônias (ufc)/mL.

### Parâmetros do laser

A irradiação foi realizada utilizando um laser arseneto de gálio com comprimento de onda de 904nm. O equipamento encontra-se no espectro eletromagnético infravermelho e possui regime de emissão pulsada com potência média de 0.0120 W, 200ns de tempo de duração do pulso, potência máxima de pico de 30W, diâmetro do feixe de 4mm, frequência de emissão de 2000Hz. O equipamento foi aferido e calibrado antes de iniciar o procedimento experimental.

### Procedimento experimental *In Vitro*

A amostra *in vitro* foi composta por 45 placas de cultura. Um swab estéril foi utilizado para inocular a bactéria *S. aureus* em uma placa Müller-Hinton utilizando um método de estrias para permitir a contagem das colônias bacterianas.

Foi realizado um antibiograma para a bactéria *S. aureus* utilizando o caldo BHI ajustado com turvação da suspensão bacteriana para o equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland para analisar a resistência e sensibilidade da cepa bacteriana frente aos antibióticos.

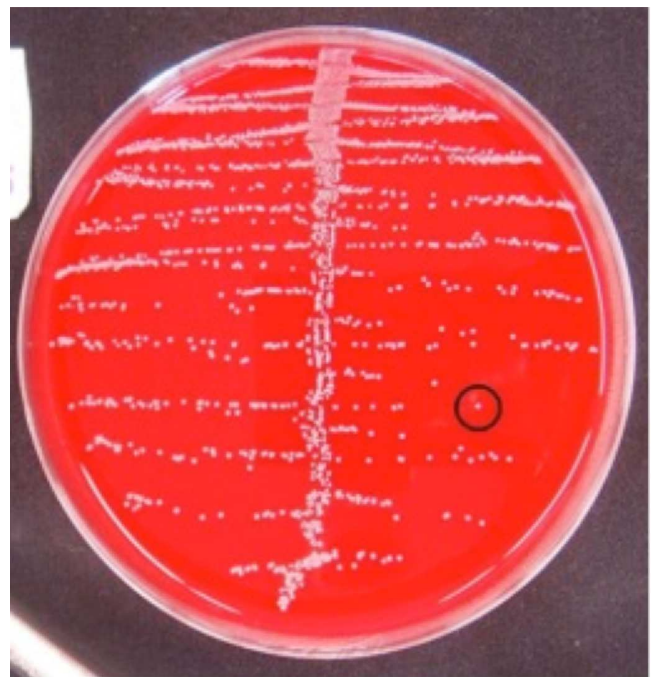
Três discos de antibióticos específicos para *S. aureus* (gentamicina, norfloxacin e amoxicilina) foram posicionados na placa controle positivo do estudo. A leitura do antibiograma foi feita a partir da medida do diâmetro de halo de inibição de cada disco, utilizando régua milimetrada. Todos os antibióticos apresentaram ação inibidora contra a cepa bacteriana testada. Isso significa que a bactéria apresentou valor da medida do halo de inibição acima do preconizado para os sete antibióticos, e que o uso desses antibióticos seria eficaz para combatê-la.

Três placas matrizes foram inoculadas com a diluição escolhida e foram identificadas e divididas em três

grupos: LASER1, CONTROLE 1 e ANTIBIÓTICO (única). Todas as placas foram incubadas por 48 horas a 35°C. Depois da incubação, as três colônias mais isoladas da placa LASER1 foram irradiadas. Imediatamente após a irradiação, as três colônias foram removidas da placa e diluídas separadamente em três tubos de ensaio contendo solução salina estéril e posteriormente replicadas, mantendo o mesmo método de semeadura por quantificação para três novas placas ágar-sangue. Na placa CONTROLE1 (controle negativo) nenhum tipo de tratamento foi empregado. As três colônias mais isoladas foram diluídas e replicadas utilizando o mesmo método utilizado nas placas LASER1. Todas as placas foram incubadas por 24 horas a 35°.

Após o período de incubação todas as placas tiveram apenas uma colônia mais isolada (Figura 1) escolhida para ser irradiada e replicada no grupo LASER e apenas replicada no grupo CONTROLE. A rotina de irradiações e replicações foram repetidas da forma descrita acima, a cada 24 horas e no mesmo período do dia, até completar sete dias de experimento, para evidenciar possível efeito cumulativo da terapia a laser de baixa intensidade. Todas as placas foram fotografadas nos períodos de 24 (matrizes) e 48 horas (derivadas) após a replicação.

A técnica de aplicação empregada foi pontual sobre cada uma das três colônias selecionadas. A caneta permaneceu situada perpendicularmente à placa e manteve-se uma distância de 1cm entre a caneta e a placa. A caneta do laser foi fixada utilizando um suporte regulável com haste e garras para tubo de ensaio, e a dose administrada foi de 3J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 1** - Placa colonizada com colônia isolada escolhida para irradiação em destaque.

### Procedimento Experimental *In Vivo*

A amostra *in vivo* foi composta por um total de 32 ratos machos, adultos, da raça Wistar, com peso entre 251-358g. Todos mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada (21°C), ciclo claro/escuro de 12h, ração sólida comercial e água *ad libitum*. Os animais foram randomicamente divididos em dois lotes de 16 animais. Os primeiros oito animais de cada lote foram identificados por número e pertenceram ao grupo GCNI (Grupo Controle Não-Infectados) e os outros oito pertenceram ao grupo GI (Grupo Infectado). Cada grupo teve quatro animais tratados com LLLT e a outra metade não recebeu nenhum tratamento.

Todos os animais foram submetidos ao seguinte procedimento cirúrgico: anestesia com cetamina a 10% (60 a 80mg/kg) e xilazina a 2% (8 a 15mg/kg), tricotomizados na região dorsal e uma incisão cirúrgica linear, sentido crânio-caudal, foi realizada no terço médio da região dorsal (um centímetro abaixo da linha entre as clavículas), com 3cm de comprimento e com profundidade até a visualização da fáscia muscular utilizando bisturi cirúrgico. O grupo Controle teve as bordas das feridas aproximadas e suturadas com dois pontos simples utilizando fio mononylon 3-0 e o grupo dos ratos Infectados teve suas feridas inoculadas com a suspensão contendo a bactéria *S. aureus* ativada utilizando um *swab* estéril e posteriormente, todas as feridas também tiveram as bordas aproximadas e suturadas.

A técnica de aplicação empregada foi o método pontual, em três pontos da ferida, mantendo 1cm de distância entre eles. A caneta permaneceu situada perpendicularmente à ferida do animal, mantendo 1cm de distância entre o spot de saída da luz laser e da ferida. Nos animais sem tratamento foi realizada uma simulação da irradiação laser com o aparelho desligado. Os animais foram irradiados a cada 24 horas no mesmo horário, até completar sete dias de tratamento, para evidenciar o possível efeito cumulativo da LLLT. No quarto dia de experimento, metade dos animais tratados do lote (dois de cada grupo) foi sacrificada. A outra metade foi sacrificada no oitavo dia de experimento, utilizando câmara de gás CO<sub>2</sub> para roedores.

Todas as amostras de pele foram coletadas e imersas em frascos contendo formalina 10%. A determinação do crescimento bacteriano foi feita utilizando uma secreção coletada da ferida em dois diferentes animais infectados que se encontravam no oitavo dia de experimento. Todos os testes (inoculação em ágar Mac Conkey, ágar-sangue e ágar manitol salgado, o teste da catalase e coagulase) confirmaram a presença da espécie *Staphylococcus aureus*.

*In vitro*: todas as placas fotografadas foram analisadas e o procedimento de leitura seguiu a seguinte padronização: determinar o campo total da placa. A seguir, as imagens das placas matrizes e derivadas foram, uma a uma, submetidas manualmente a uma calibração através

de uma seleção de cores, onde o sistema reconheceu a área composta por ágar-sangue pela cor verde e o restante do conteúdo da placa, que representa a área composta por colônias da bactéria, foi ajustado para ser reconhecido pela cor amarela.

*In vivo*: todas as amostras de pele foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e colocadas na parafina. Depois foram cortadas em fragmentos de 4mm de espessura e coradas com Picrosirius (PS). A leitura das lâminas de PS foi realizada através da obtenção de duas fotomicrografias por lâmina em um microscópio óptico com câmaras de captura, utilizando-se lente polarizada.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital e, posteriormente, congeladas e digitalizadas por uma placa digitadora, cuja imagem era enviada a um computador. Para cada corte histológico, foi realizada a leitura de dois campos aleatórios com ampliação de 400x para avaliar a porcentagem de colágeno tipo I e III. A porcentagem de área ocupada pelas fibras vermelhas (colágeno tipo I) e verdes (colágeno III) foi calculada.

### Análise estatística

Para a comparação dos grupos em relação à variáveis quantitativas, foi considerado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Na comparação dos resultados nos dias consecutivos de avaliação, dentro de cada grupo, foi usado o teste não-paramétrico de Friedman. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

## RESULTADOS

*In vitro*: os resultados das médias obtidas em relação à área/fundo (A/F) que comparou os grupos Laser e Controle durante todos os dias do experimento, considerando as placas matrizes e derivadas, não apresentaram variação significativa entre as médias da A/F entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ), em outras palavras, os grupos apresentaram características de crescimento semelhantes, com baixa dispersão das médias durante todo o período experimental. As placas matrizes atingiram valores  $p$  ainda mais altos do que as placas derivadas, atingindo valor de "1" no segundo e terceiro dia de experimento. Ao longo da execução do protocolo experimental, testou-se, em cada grupo (intragrupo), a hipótese de existir um efeito cumulativo da terapia a laser de baixa intensidade, considerando as placas matrizes e derivadas. O teste afirmou a igualdade dos resultados ao longo dos dias do experimento.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à área sob a curva (ASC), considerando todas as avaliações nos dias consecutivos nas placas matrizes e derivadas. Em valores absolutos, os grupos têm resultados da área sob a curva (ASC) com distribuição normal (Figuras 2 e 3).

Os percentuais de variação da variável A/F para cada dois dias consecutivos de avaliação ao longo do ex-

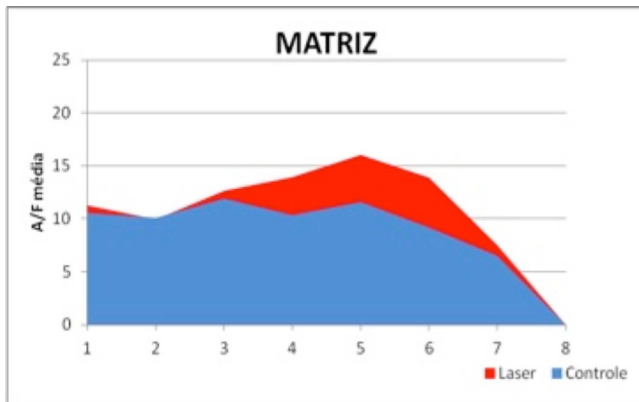


Figura 2 - Área abaixo da curva nas placas matrizes.

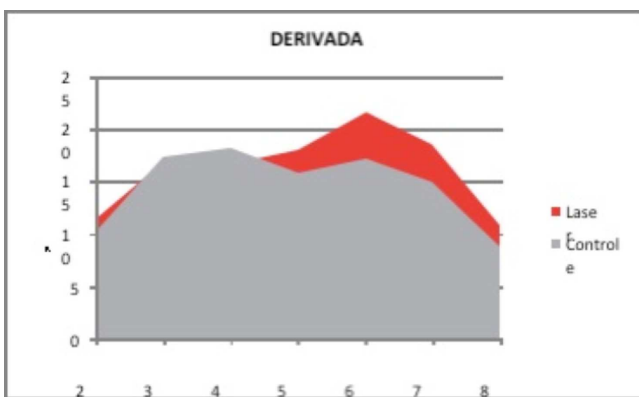


Figura 3 - Área abaixo da curva nas placas derivadas.

perimento foram calculados nos dois grupos experimentais, incluindo as placas matrizes e derivados. Os percentuais não apresentaram diferença estatística significativa nas variações ( $p > 0,05$ ). Nas placas matrizes o maior percentual de variação para os grupos ocorreram entre o segundo e o terceiro dia (34,07%, Laser e 20,76%, Controle) e entre o sexto e o sétimo dia (31,73%, Laser e 26,76%, Controle). Nas placas derivadas o maior percentual ocorreu entre o segundo e o terceiro dia (45,98%, Laser e 85,67%, Controle).

*In vivo*: ocorreu o óbito de dois ratos do grupo Infectado (tratados com irradiação laser) após o procedimento cirúrgico. Não ocorreram quaisquer outras complicações com os animais no decorrer do experimento. Para a comparação dos grupos em relação à área de colágeno,

testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos dois grupos em comparação versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. O resultado da comparação do colágeno entre os grupos experimentais CONTROLE x INFECTADOS (intergrupos), para cada dia de avaliação, indicou diferença significativa apenas entre os grupos experimentais controle e infectados irradiados com a terapia a laser de baixa intensidade, quando avaliados no quarto dia de experimento ( $p = 0,034$ ). Os outros grupos comparados não mostraram variação significativa em nenhuma das duas variáveis (colágeno tipos I e III) em nenhum dos dias de avaliação (Tabela 1).

Na comparação de colágeno em cada grupo (intragrupo) em relação ao momento de avaliação (4º e 8º dia de experimento) foi testada a hipótese nula de que as médias de deposição de colágeno tipo I e III são iguais para os dois momentos de avaliação, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um momento tem média diferente das demais. Em nenhum momento das comparações ocorreu diferença significativa, indicando que os valores são semelhantes em todos os momentos de avaliação em um mesmo grupo.

Na avaliação realizada no quarto e no oitavo dia para os colágenos tipo I e III, no grupo controle irradiado, o valor de "p" atingiu 0,867; no grupo controle não irradiado, valor de  $p = 0,491$ ; no grupo infectado, valor de  $p = 0,104$ ; e no grupo não infectado, valor de  $p = 0,094$ .

Os resultados da comparação do colágeno em relação à terapia a laser de baixa intensidade, dentro do grupo controle, em cada momento de avaliação, não apresentaram diferença estatística significativa para o efeito do tratamento com LILT. Os animais do grupo controle tratados com LILT não demonstraram maior ou menor efetividade sobre a deposição dos colágenos tipo I e III em relação aos não irradiados, obtendo valor de  $p = 0,867$  quando avaliados no quarto dia e valor de  $p = 0,590$  quando avaliados no oitavo dia. Comparando a efetividade dentro do grupo dos animais infectados em cada momento de avaliação, apesar de demonstrar um discreto aumento de deposição de colágeno que pode ser observado em um valor maior nas médias, não houve diferença estatisticamente significativa. Os animais infectados tratados com LILT não mostraram maior ou menor efetividade na deposição de colágeno tipos I e III em relação ao grupo não irradiado, obtendo valor de  $p = 0,101$  quando avaliados no quarto dia e valor de  $p = 0,224$  quando avaliados no oitavo dia.

Tabela 1 - Controle x Infectados irradiados com terapia a laser avaliados no quarto dia de experimento.

| Variável | Grupo   | n  | Media | Mediana | Mínimo | Maximo | Desvio padrão | Valor de p |
|----------|---------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|------------|
| COL I    | GC I 4D | 16 | 82,02 | 88,18   | 60,15  | 97,97  | 12,42         | 0,034      |
|          | GI I 4D | 14 | 91,27 | 91,57   | 83,28  | 98,102 | 39,77         |            |
| COL III  | GC I 4D | 16 | 17,97 | 11,81   | 20,24  | 39,84  | 12,42         | 0,034      |
|          | GI I 4D | 14 | 87,26 | 84,26   | 18,93  | 16,71  | 39,77         |            |



As figuras 4 e 5 demonstram a variação das médias quantificadas em porcentagem das variáveis colágeno tipo I e tipo III em seus diferentes grupos (controle x infectados), subgrupos (irradiados x não irradiados) e tempos de avaliação (quarto e oitavo dia de experimento).

## DISCUSSÃO

A infecção resulta em destruição do tecido afetado e também em atraso da cicatrização da ferida e formação da cicatriz. Pelos achados em trabalhos prévios, notadamente, a eficácia da LILT sobre o reparo tecidual foi verificada em vários protocolos<sup>9-4,18</sup>. Nenhum trabalho, até o presente momento, validou o uso da laserterapia quando há a presença de infecção bacteriana na ferida.

Nas referências pesquisadas sobre o emprego da LILT no processo de cicatrização de feridas infectadas, pode-se destacar a variabilidade na metodologia utilizada, bem como, nos resultados encontrados.

A padronização da escolha do equipamento laser e dos parâmetros empregados, como comprimento de onda, tempo, frequência, intensidade para reparação de tecidos concomitante à infecção bacteriana, apresentam grande variação na literatura consultada<sup>10,12,15,19-24</sup>.

O laser arseneto de gálio foi escolhido por ser um dos lasers mais utilizados na prática fisioterapêutica, capaz de produzir alterações significantes em úlceras cutâneas e feridas operatórias de humanos; tem sido utilizado com diferentes doses. Melhores resultados foram observados com doses relativamente baixas. Doses de 3 ou 4J/cm<sup>2</sup> produzem melhores resultados que 5J/cm, quando avaliado o crescimento celular e a síntese de colágeno em cultura de fibroblastos, e doses acima de 4J por ponto podem inibir a atividade dos fibroblastos<sup>25</sup>. Esses estudos demonstram que doses muito altas de energia não parecem prover os melhores efeitos de reparação tissular.

A terapia a laser foi empregada diariamente pelo período de sete dias nos estudos *in vitro* e *in vivo*. A literatura sugere que o estímulo do crescimento bacteriano é significativamente aumentado por repetidas irradiações se comparadas a uma única exposição.

Tratamentos com laser são geralmente aplicados em feridas três a cinco vezes por semana, e, portanto, em feridas infectadas, deve se considerar os efeitos cumulativos do tratamento<sup>26</sup>.

A escolha do método de pesquisa *in vitro* baseou-se em estudos prévios encontrados na literatura<sup>13,19,24</sup> que realizaram diversos experimentos avaliando os efeitos do laser sobre diferentes tipos de bactérias utilizando variações no comprimento de onda, dose e frequência<sup>13,19,21,22,24</sup>. A maioria dos estudos praticaram a irradiação das placas em uma única sessão (prática metodológica comum nesse tipo de estudo)<sup>21,24</sup> e a contagem das colônias bacterianas eram feitas até após 24 horas<sup>19,23,24</sup>.

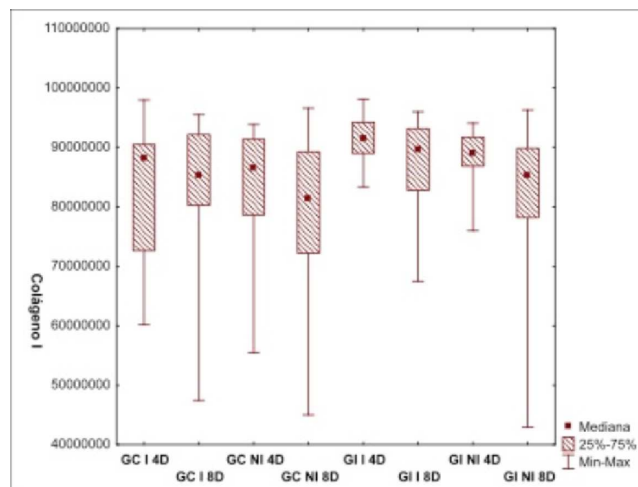


Figura 4 - Colágeno tipo I.

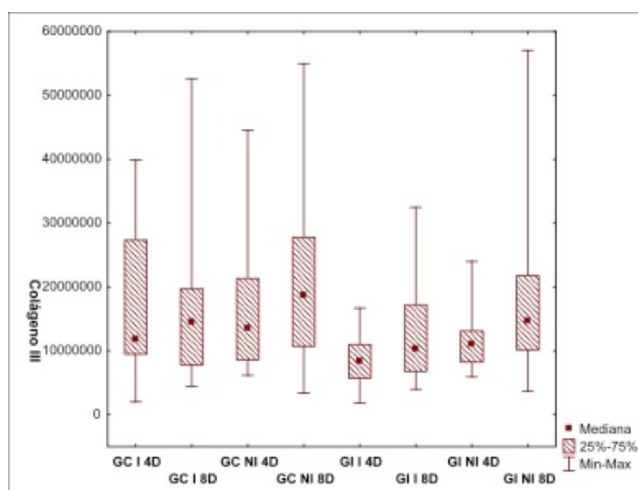


Figura 5 - Colágeno tipo III.

Para este experimento, foi elaborado um desenho de pesquisa voltado para reproduzir, *in vitro*, condições comuns na prática da fisioterapia atual. Nas pesquisas pré-existentes, quase por unanimidade, os autores sugerem em futuras investigações a necessidade de um número maior de séries de exposição das placas à luz laser com a finalidade de vislumbrar um possível efeito cumulativo da LILT e, também, incorporar a metodologia utilizada em modelos mais complexos, como feridas infectadas *in vivo*, utilizando modelos animais em primeira instância.

O interesse do estudo de observação *in vivo* do potencial da LILT é teoricamente baseado na avaliação das citocinas pró-inflamatórias liberadas após exposição celular à laserterapia e avaliação das funções dos monócitos, macrófagos e linfócitos nas feridas, condições que o meio ágar-sangue não é capaz de proporcionar<sup>27</sup>.

Diferentemente dos demais encontrados na metodologia da literatura, por prevenção e precaução, a LILT foi iniciada apenas 24 horas após o procedimento cirúrgico. No estudo *in vitro*, este fato é justificado por este

ser o período necessário para que as placas semeadas e incubadas em estufa sofram crescimento bacteriano visível a olhos nus. No estudo *in vivo*, além de manter a padronização dos parâmetros, o fato também pode ser justificado por não ser indicado o uso da terapia a laser durante o sangramento, pois provoca aumento do fluxo sanguíneo.

A terapia a laser, nos parâmetros utilizados, não foi capaz de provocar qualquer efeito bioestimulante sobre as bactérias no meio *in vitro*. Contudo, vale ressaltar que o modo de aplicação (única dose sobre a colônia isolada sem contato da caneta aplicadora com a placa de cultura), pode ter sido responsável pela ausência de efeitos sobre o crescimento bacteriano, visto que este tipo de aplicação pode ocasionar perda significativa de energia<sup>27</sup>, pois a irradiação, nesse caso, cai devido à lei do quadrado inverso (a intensidade da radiação incidente é inversamente proporcional ao quadrado da distância entre a fonte e a superfície) e ao aumento da reflexão. O uso de doses relativamente baixas e uma única exposição à irradiação são também fatores que podem justificar a falta de efeitos sobre o crescimento bacteriano *in vitro*.

De acordo com os achados no presente estudo parece que a condição de cultivo é determinante para o crescimento de micro-organismos. Embora não totalmente compreendido, após a irradiação com LILT, a participação de células hematopoiéticas parece ser fundamental na reação de defesa do hospedeiro. O meio ágar-sangue parece não corresponder às condições *in vivo*, apesar da pre-

sença de alta concentração de hemoglobina. A teoria baseada na observação de citocinas pró-inflamatórias liberadas após a exposição celular ao LILT relatada por Moore<sup>27</sup> parece ser a melhor linha de continuidade de estudos nessa área.

É de extrema importância novos estudos que avaliem no meio *in vivo* os efeitos da LILT sobre o infiltrado inflamatório quando aplicado por período prolongado em feridas infectadas, com a finalidade de buscar mais respostas sobre a existência ou não de interferência no processo de cicatrização das feridas.

Considerando que este trabalho é original, a dificuldade encontrada é a de comparar os resultados com aqueles relatados previamente. Como sugestão de trabalhos futuros, seria de interesse investigar o uso da LILT em um controlado estudo em feridas animais e, posteriormente, humanas para determinar os efeitos do tratamento com a LILT sobre o crescimento da bactéria e também sobre a extensão de cicatrização do tecido hospedeiro.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que os efeitos da irradiação com LILT AsGa com comprimento de onda de 904nm, dose de 3J/cm<sup>2</sup>, *in vitro*, não alterou o crescimento bacteriano de *S. aureus* nos grupos experimento e controle, nas placas matrizes e nem nas derivadas, até o oitavo dia de avaliação. *In vivo*, demonstrou aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e III na cicatriz nos grupos dos animais infectados e irradiados, quando avaliados no quarto dia de experimento.

## A B S T R A C T

**Objective:** To compare the effects of low intensity laser therapy on *in vitro* bacterial growth and *in vivo* in infected wounds. and to analyze the effectiveness of the AsGa Laser technology in *in vivo* wound infections. **Methods:** *in vitro*: Staphylococcus aureus were incubated on blood agar plates, half of them being irradiated with 904 nm wavelength laser and dose of 3J/cm<sup>2</sup> daily for seven days. *In vivo*: 32 male Wistar rats were divided into control group (uninfected) and Experimental Group (Infected). Half of the animals had their wounds irradiated. **Results:** *In vitro*: there was no statistically significant variation between the experimental groups as for the source plates and the derived ones ( $p > 0.05$ ). *In vivo*: there was a significant increase in the deposition of type I and III collagen in the wounds of the infected and irradiated animals when assessed on the fourth day of the experiment ( $p = 0.034$ ). **Conclusion:** Low-intensity Laser Therapy applied with a wavelength of 904 nm and dose 3J/cm<sup>2</sup> did not alter the *in vitro* growth of *S. aureus* in experimental groups; *in vivo*, however, it showed significant increase in the deposition of type I and III collagen in the wound of infected and irradiated animals on the fourth day of the experiment.

**Key words:** Infection. Laser therapy. Laser therapy, low-level. Wound healing. *In vitro*.

## REFERENCIAS

- Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JF, Ferreira JV, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação HeNe. *Fisioter Bras.* 2003;4(4):253-8.
- Miró L, Coupe M, Charra C, Jambon C, Chevalier JM. Estudio calioscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la micro-circulation. *Inv Clin Laser.* 1984;1(2):9-14.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5(1):31-9.
- Lyons RF, Abergel RP, White RA. Biostimulation of wound healing *in vivo* by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg.* 1987;18(1):47-50.
- Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci.* 1990;5(4):381-6.
- Gonçalves G, Parizotto NA. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. *Rev Bras Fisiot.* 1998;21:5-13.
- Roig JLG, Trasobares EML, Sanchez HM, Alvarez AVJ. Tratamiento de las úlceras por presión em el lesionado medular com laser de baja potencia y cirugía. Presentacion de um caso. *Rev Cuba Ortop Traumatol.* 1990;4(2):41-5.
- Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Kerschman K, Knobler R, Schindl L. Diabetic neuropathic foot ulcer: successful treatment by low-intensity laser therapy. *Dermatology.* 1999;198(3):314-6.

9. Kawamoto K, Senda N, Shimada K, Ito K, Hirano Y, Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyrromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. *Lasers Med Sci*. 2000;15(4):257-62.
10. Karu TI, Tiphlova OA, Fedoseyeva GE, Kalendo GS, Letokhoy VS, Lobko VV, et al. Biostimulating action of low-intensity monochromatic visible light: is it possible? *Laser Chemistry*. 1984;5(1):19-25.
11. Karu TI, Tiphlova OA, Letokhoy VS, Lobko VV. Stimulation of *E. coli* growth by laser and incoherent red light. *Il Nuovo Cimento D*. 1983;2(4):1138-44.
12. Gupta AK, Filonenko N, Salansky N, Sauder DN. The use of low energy photon therapy (LEPT) in venous leg ulcers: a double-blind, placebo-controlled study. *Dermatol Surg*. 1998;24(12):1383-6.
13. Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B. Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther*. 1994;74(9):812-23; discussion 824-5.
14. Colls J. La terapia laser hoy. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec; 1984.
15. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol*. 1995;27(3):219-23.
16. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves R, Parizoto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisiot Bras*. 2001;2(4):221-40.
17. Herascu N, Velciu B, Calin M, Savastru D, Talianu C. Low-level laser therapy (LLLT) efficacy in post-operative wounds. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(1):70-3.
18. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999;49(1):1-17.
19. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50J/cm<sup>2</sup> on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(6):325-33.
20. Tiphlova O, Karu T. Action of low-intensity laser radiation on *Escherichia coli*. *Crit Rev Biomed Eng*. 1991;18(6):387-412.
21. Carvalho P, Silva R, Silva R J. Estudo microbiológico in vitro do crescimento bacteriano após aplicação do laser HeNe em úlceras de decúbito com infecção bacteriana. *Fisioter Bras*. 2001;2(3):183-8.
22. Coutinho F, Giordano V, Santos CM, Carneiro AF, Amaral NP, Touma MC, et al. O efeito do laser de baixa energia no crescimento bacteriano "in vitro". *Rev Bras Ortop*. 2007;42(8):248-53.
23. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res*. 1994;100:43-6.
24. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(5):283-90.
25. Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263-7.
26. Kim KS, Lee PY, Lee JH, Kim YK. Effects of low level laser irradiation with 904 nm pulsed diode laser on *Staphylococcus aureus*. *Laser Therapy*. 1997; 9(3):121-30.
27. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005;36(1):8-12.

Recebido em 12/11/2012

Aceito para publicação em 05/01/2013

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

#### Como citar este artigo:

Von Bahten LC, Paula JB, Cielinski J, Pilonetto M, Von Bahten LC. Efeitos do laser de baixa intensidade em cultura bacteriana in vitro e ferida infectada in vivo. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2014;41(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

#### Endereço para correspondência:

Luiz Carlos von Bahten

E-mail: [vonbahten@yahoo.com.br](mailto:vonbahten@yahoo.com.br)