

ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TECIDUAL EM RATOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (HE-NE)

**Ana Carulina Guimarães Belchior^{1,2}, Filipe Abdalla dos Reis^{1,2},
Paulo de Tarso Camillo de Carvalho¹, Marcos Tadeu Pacheco¹**

¹ Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento,
Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova - São José dos Campos - SP - Brasil

² Universidade para o Desenvolvimento do Estado e Região do Pantanal – UNIDERP,
Av. Alexandre Herculano, 1400 - Parque dos Poderes - Campo Grande - MS - Brasil
carulms@pop.com.br, fi_abdalla@terra.com.br, ptpaulo@terra.com.br

Resumo- Este trabalho relata a ação do laser He-Ne no processo de cicatrização de feridas incisionais em ratos Wistar quando comparado a um grupo controle, não irradiado, através da análise quantitativa de fibras de colágeno após a retirada da amostra tecidual no 15º dia de pós-operatório. Observou-se a aceleração do processo cicatricial pela maior porcentagem de fibras colágenas depositadas no grupo irradiado em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: Laser, regeneração, tecido.

Área do Conhecimento: IV - Ciências da Saúde

Introdução

A reparação dos tecidos é uma integração de processos interativos dinâmicos que envolvem mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas [1].

A matriz extracelular é produzida durante a fase fibroblástica, com a ativação de macrófagos na ferida e pela elaboração de fatores de crescimento específicos para o depósito de um tecido conjuntivo forte e elástico, formado principalmente por fibras colágenas [2].

A situação mais favorável para a reparação é quando a ferida está fechada, suturada e não infectada, condição conhecida como ferida incisional e, em oposição, temos a ferida excisional [3].

O laser vem sendo estudado em diferentes campos de atuação. No que se refere ao de baixa potência, os efeitos descritos na literatura são com relação à reparação tecidual, melhorando a regeneração e a cicatrização de tecidos [4].

Woodruff et al. [5] em revisão da literatura sobre a eficácia da terapia a laser no reparo de lesões afirmam que embora a maioria dos estudos demonstra o laser de baixa potência exercendo efeito positivo nestes processos, principalmente no que se refere à aceleração do reparo e ao aumento de resistência do tecido cicatricial, outros pesquisadores relatam não haver qualquer diferença na evolução de uma ferida irradiada e outra controle.

Devido aos resultados contraditórios, mostrou-se relevante o estudo comparativo do processo de cicatrização de lesões incisionais em

ratos quando submetidos ao tratamento de laserterapia de baixa potência (He-Ne) através da análise quantitativa das fibras de colágeno.

Materiais e Métodos

Animais de experimentação

Foram utilizados 16 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 200 a 300 gramas, provenientes do Biotério Central - UNIDERP, mantidos em condições controlada de luminosidade e temperatura, com alimentação e água *ad libitum*.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, conforme o procedimento realizado:

Grupo 1 (controle): constituído por oito animais submetidos à ferida incisional e não-irradiados;

Grupo 2 (irradiado): composto por oito animais submetidos à ferida incisional e subsequentes irradiados com o laser na região lesionada por 15 dias consecutivos;

Procedimentos

Método Cirúrgico

Os animais (Grupo 1 e 2) foram anestesiados com Tiopental Sódico (50mg/kg), via peritoneal. Após o procedimento anestésico, realizou-se a tricotomia da região dorsal, com extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. Assim, realizou-se uma incisão de

aproximadamente 7 cm de comprimento e 0,2 de largura, abrangendo apenas o tecido epitelial, paralela à linha mediana posterior, sendo suturada com fio de mononylon 5.0.

Aplicação do laser

Utilizou-se o Laser He-Ne da marca KLD® modelo PLASMAX IV e as aplicações deram-se sobre a forma de varredura, transcutâneamente, com dose pré-determinada de 4 joules/cm². Apenas o grupo 2 (irradiado) recebeu o tratamento após o procedimento cirúrgico e nos 15 dias consecutivos (Fig. 1).



Figura 1: Modo de aplicação da terapia a laser (He-Ne) no Grupo 2.

Análise Histológica

No 15º dia de pós-operatório, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico para a remoção de pequeno fragmento de tecido da incisão.

Para a fixação do material, este foi imerso em formaldeído por 24 horas, seguido pela aplicação de concentrações crescentes de álcool etílico (90%, 95% e 100%), por 60 minutos, cada.

Em seguida, o material foi submerso em xilol por 60 minutos, aplicando-se a parafina histológica para o emblocamento.

Realizaram-se cortes de 4 µm, posteriormente colocados em lâminas e levadas à estufa a 60°C por 12 minutos.

Após, o material ser hidratado com a utilização de álcool 100I – 5 minutos; álcool 100II – 5 minutos; álcool 95% - 5 minutos; álcool 80% - 5 minutos; álcool 70% - 5 minutos, utilizou-se a hematoxilina de Harris, para coloração por 5 minutos sendo então aplicada água corrente por 10 minutos.

Finalizado o processo anterior, aplicou-se fucsina ácida por 30 segundos, posteriormente lavados em água destilada para o emprego de ácido fosfomolibídico, durante 8 minutos seguida pela coloração de azul anilina durante 7 minutos.

Novamente o material foi desidratado: álcool 95% - 5 minutos; álcool 100I – 5 minutos; álcool 100II – 5 minutos; álcool / xilol – 1:1 – 5 minutos.

Para a montagem das lâminas, o material permaneceu em xilol II até a colocação da lamínula.

Após a confecção das lâminas, a leitura deu-se através da seleção de quatro campos distintos, de forma padronizada, através de Microscópio óptico acoplado a um sistema capturador de imagem, com lente objetiva de 40º e ocular 10º, seguida pela análise do tecido colagenoso através do programa ImageLab.

Análise estatística

Utilizou o Teste da Soma de Postos de Wilcoxon e o Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

Resultados

O resultados obtidos pelo Teste da Soma de Postos de Wilcoxon foi de $z = 2,00$, ou seja, superior ao valor crítico 1,96, logo, rejeitamos a hipótese (nula) de médias iguais.

Para a hipótese (alternativa) de que as médias no mesmo grupo são diferentes, foi utilizado o Teste de Kruskal – Wallis, onde obtivemos, para o Grupo A, $H = 2,780$ e para o Grupo B, $H = 2,4$, ou seja, valores inferiores ao crítico de 5,991. Logo, não rejeitamos a hipótese (nula) de que as médias nestes grupos foram iguais.

Em relação às imagens obtidas após a biópsia de ambos os grupos, as fibras colágenas demonstram-se irregulares, porém em menor quantidade e menos espessas no Grupo A (Fig. 2).

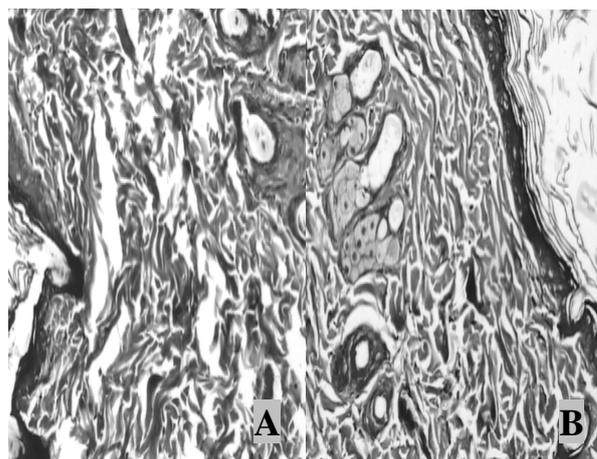


Figura 2 – Imagens histológicas: A - Grupo controle e B – Grupo Irradiado

Comparando o Grupo A e o Grupo B quanto à quantidade de colágeno, pode-se afirmar que no primeiro, o valor é significativamente menor (88,21%) que no segundo grupo (92,69%), obtendo $p=0,012$.

Discussão

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos buscando novas descobertas quanto os efeitos terapêuticos promovidos pelo tratamento a laser, principalmente os de baixa potência, pelo efeito de bioestimulação.

A obtenção do aceleração da cicatrização das feridas incisionais através da análise quantitativa de fibras colágenas corrobora com o estudo de Rigau [6] em que analisou o processo cicatricial através da relação do aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos.

A escolha da aplicação do laser logo após o procedimento cirúrgico baseou-se no trabalho de Lopes [4] em que relata maior afluência de elementos defensivos e um elevado número de mitoses das células do estrato germinativo especialmente nas primeiras 24 horas após a lesão, assim como a determinação da densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ baseada na literatura [7-8] que afirma que densidades entre 1 e $3\text{J}/\text{cm}^2$ são indicadas para alcançar melhoras na ação circulatória local e que de 3 a $6\text{J}/\text{cm}^2$, promover ação regenerativa, além de outros trabalhos que selecionaram esta densidade [9-10] atribuindo melhores resultados.

Segundo Lopes [4] o laser de baixa potência atua mais na fase proliferativa do processo cicatricial que se inicia, aproximadamente, no 10º dia após a lesão. Conforme Robbins [11] até o 5º dia da injúria a neovascularização atinge um pico e o número de fibroblastos é maior que o de fibras colágenas, pois é nesse período que ocorre a síntese do mesmo, sendo a partir do 14º dia que ocorre um persistente acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos. Nessa mesma ocasião, inicia-se o prolongado processo de empalidecimento da cicatriz, sendo esta decorrente do aumento do acúmulo de colágeno na cicatriz incisional e da involução dos canais vasculares.

A verificação do maior número de fibras colágenas e uma menor quantidade de vasos capilares e fibroblastos no grupo irradiado quando comparado ao grupo controle assemelha-se aos relatos de Ikeuchi et al. [12]. Igualmente, ferimentos tratados com o laser facilitaram o processo cicatricial, sendo considerado um facilitador no processo de reparação [13].

Outro estudo, tentando verificar a ação do laser em animais tratados com esteróide que é um inibidor do processo de reparação tecidual, reduzindo diretamente a formação de colágeno, encontraram resultados satisfatórios, havendo o aceleração cicatricial no grupo irradiado comparado ao grupo controle [14].

Ao correlacionarmos a quantidade do colágeno existente entre os grupos, nossos resultados demonstram maior quantidade de fibras colágenas no grupo irradiado, constatando

o efeito bioestimulador da terapia a laser de baixa potência, que é afirmada por vários autores [7, 8, 15].

Conclusão

Pode-se concluir que o processo de cicatrização em lesões incisionais em ratos quando submetidos ao tratamento de laserterapia de baixa potência (He-Ne) promovem de forma mais eficiente a reparação tecidual acompanhada pela maior quantidade de fibras colágenas quando comparado com grupo controle, não irradiado.

Referências

- [1] COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- [2] CARVALHO, P.T.C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, 2002.
- [3] BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- [4] LOPES, L.A. Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblasto de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. 1999. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba, 1999.
- [5] WOODRUFF, L.D.; BOUNKEO, J.M.; BRANNON, W.M.; DAWES, K.S.; BARHAM, C.D.; WADDELL, D.L.; ENWEMEKA, C.S. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery**: v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.
- [6] RIGAU, J. Acción de lá luz laser de baja intensidad em lá modulation de lá función celular. 1996. 211 f. Dissertação (Doutorado em Medicina). Universitat Rovira i Virgili, 1996.
- [7] KITCHEN, S.; BAZIN, S. Eletroterapia de Clayton. 10ª ed. São Paulo: Manole, 1998.
- [8] GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia Dermato-Funcional – Fundamentos, Recursos e Patologias. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2002.
- [9] TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico:

utilização do LASER de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 23, 1998.

[10] CARVALHO, P.T.C.; MAZZER, N.; CORAZZA, A.V.; RADUAM, R.M. Os efeitos do LASER de Baixa Intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes mellitus experimental. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 241-246, 2001.

[11] ROBBINS, S.L. Patologia Estrutural e Funcional. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

[12] IKEUCHI, S.; OHSAKA, F.; ASANAMI, S.; NOMOTO T. Effect of low power He-Ne laser on the healing of full-thickness skin defects. **Laser in Dentistry**, p. 85-89, 1989.

[13] HOPKINS, J.T.; MCLODA, T.A.; SEEGMILLER, J.G; BAXTER, G.D. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **Journal of Athletic Training**, v. 39, n. 3, p. 223-229, 2004.

[14] PESSOA, E.S.; MELHADO, R.M.; THEODORO, L.H.; GARCIA, V.G. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 3, p. 199-204, 2004.

[15] LOW, J.; REED, A. Eletroterapia Explicada – Princípios e Prática. 3^a ed. São Paulo: Manole, 2001.