

# PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EM PLANÁRIAS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO LASER NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE REGENERAÇÃO TECIDUAL

Neila Maria Rocha Garcia<sup>1</sup>, Allison Gustavo Braz<sup>1</sup>, Leandro Procópio Alves<sup>1</sup>, Sandra Cristina de Souza<sup>1</sup>, Miguel Angel Castillo Salgado<sup>2</sup>, Viviane Pilla<sup>1</sup>, Egberto Munin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Univap – Av. Shishima Hifumi 2911  
12244-000 São José dos Campos - SP,

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Av. Engenheiro Francisco José Longo 777, 12245-000 - São José dos Campos, SP, Brazil  
neila@univap.br, fisiobraz@hotmail.com

**Resumo** - Recentemente, tem-se observado grande interesse científico a respeito da interação da radiação óptica com sistemas biológicos vivos. Este trabalho faz uso de planárias como modelo animal para estudos *in vivo* da interação laser-tecido biológico. O objetivo do trabalho foi avaliar a dinâmica de proliferação de células tronco em planárias, mediante interação com radiação laser, nos estágios iniciais do processo de regeneração tecidual. Para tal, foi utilizado um laser de diodo de 35 mW em 660 nm. Os resultados indicaram que o laser induz um crescimento exponencial na quantidade de células na região sob regeneração, durante o período estudado (até o terceiro dia após amputação dos espécimes).

**Palavras-chave:** planária, *Dugesia tigrina*, neoblastos, células tronco

**Área do Conhecimento:** Engenharias

## Introdução

A reparação tecidos lesionados por processos patológicos ou traumáticos é considerada um grande desafio para a ciência atual, constituindo uma área de pesquisa extremamente dinâmica.

Definimos a reparação tecidual como sendo um processo sistêmico e dinâmico de reabilitação do tecido biológico perdido e a regeneração tecidual corresponde à substituição de células da mesma linhagem, com o propósito de recuperar a estrutura e a função do tecido original (BLANES, 2004, CANDIDO, 2001).

Vários estudos demonstram que o processo de regeneração tecidual está sendo estudado em vários modelos experimentais. Dentre eles, a planária de água doce (*Dugesia tigrina*) é considerada um excelente modelo devido as suas características regenerativas, pois a mesma apresenta o mecanismo de modelação celular em todo ciclo vital (REDDIEN and ALVARADO, 2004).

O estudo dos mecanismos celulares para a regeneração de muitas espécies deste filo animal contribui para a pesquisa biomédica nas áreas de regeneração tecidual, subsistência de células-tronco e desordens degenerativas (ALVARADO et al., 2002).

Atualmente, são estudadas técnicas que visam melhorar e acelerar a reparação dos tecidos traumatizados. Os lasers não cirúrgicos vêm sendo utilizados com muito sucesso na reparação tecidual de diferentes tecidos, como pele (MESTER; MESTER, 1989), células do sistema nervoso (ROCHKIND, et. al; 1989), tecido

muscular (WEISS e ORON, 1992) e ósseo (LOPES et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram que o laser estimula a síntese de colágeno (ABERGEL, 1987), fatores de crescimento (YU, 1994) e aumento da vascularização tecidual (ROCHA; 2004).

A radiação Laser é absorvido pelas células constituintes dos tecidos, promovendo um aumento do metabolismo celular a partir do nível de ATP produzido pela mitocôndria. A biomodulação positiva causada pelo laser não cirúrgico ocorre em nível molecular (ALMEIDA-LOPES et al; 2001), sendo que os efeitos dependem do comprimento de onda, dosimetria e intensidade do feixe (KARU, 1999).

Em nosso estudo recente (SOUZA et al., 2005), foi observado o efeito biomodulador da radiação laser em 685 nm na regeneração de planárias (*Dugesia tigrina*). Foi observado que a radiação laser teve um papel importante na proliferação do neoblasto (célula tronco em planárias) quando comparada às planárias não irradiadas.

Neoblastos são células indiferenciadas, com núcleo grande e muito pouco citoplasma, que estão distribuídas por todo o corpo das planárias adultas e de outros platelmintos (WAGNER 1890, LEHNERT 1891, KELLER 1894). Possuem de 5 a 8 µm de diâmetro, são células. Morfologicamente os neoblastos representam de 25 a 30% de todas as células das planárias (BAGUÑÀ ET AL. 1989).

O objetivo deste estudo foi de avaliar histologicamente o efeito de biomodulação produzido pela radiação laser de baixa potencia,

no processo regenerativo de planárias (*Dugesia tigrina*) durante o estágio inicial da regeneração.

## Materiais e Métodos

Para este trabalho, foram utilizados organismos adultos de planárias da espécie *Dugesia tigrina* coletados do seu habitat natural, uma represa situada na cidade de Paulínia – SP – Brasil, e mantidas em ambiente de Laboratório com temperatura entre 19 a 21°C, em recipientes plásticos contendo água não clorada, sendo alimentadas, uma vez por semana, com fígado bovino fresco fragmentado.

Foram selecionados 52 animais com perfeita morfologia (0,5–1,5 cm). Para a anestesia dos espécimes foi utilizado um dispositivo de resfriamento, desenvolvido em nosso laboratório, aqui no IPD, especialmente para este fim. O corte dos espécimes foi realizado na região entre a cabeça e o corpo (figura 1), com um bisturi e com auxílio de uma lupa estereoscópica acoplada a um monitor de vídeo (Figura 2).



Figura 1: Representação esquemática do local do corte.

Para o acompanhamento do processo regenerativo foi utilizado o fragmento corpo de cada animal, tendo sido descartado o fragmento cabeça. Foram estabelecidos dois grupos experimentais, um grupo controle não irradiado e outro grupo irradiado por um minuto.



Figura 2: Equipamento para manipulação e corte dos espécimes.

O laser utilizado na irradiação foi um laser de diodo, da empresa MM Optics LTDA, modelo Twin Laser (Figura 3).

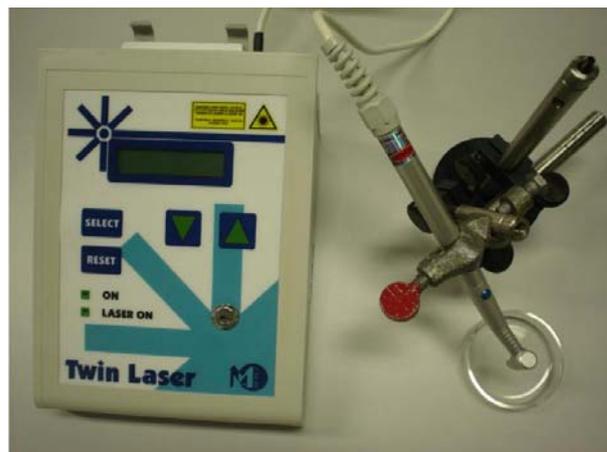


Figura 3: Laser de diodo utilizado para irradiação dos animais (35 mW, 660 nm).

Os parâmetros da irradiação utilizados seguiram protocolo anteriormente estudado. O laser, com comprimento de onda de 660 nm, foi ajustado para uma potência óptica de saída de 35 mW. A área iluminada no plano do animal foi de 0,385 cm<sup>2</sup>. e o tempo de irradiação foi de 60 segundos.

Imediatamente após o seccionamento, procedeu-se a fixação de 5 animais do grupo controle e a irradiação e fixação de 8 animais do grupo irradiado. Durante o período experimental determinado, o tratamento com laser foi aplicada a cada 24 horas. Os sacrifícios também ocorreram a cada 24hs, sempre no mesmo horário.

Como procedimento de técnica histológica, inicialmente obteve-se a fixação das amostras com solução de Bouin, seguida da desidratação que foi realizada adotando-se ordem crescente de concentração dos álcoois (70%, 95%, 100%) por 15 minutos cada e a diafanização por xilol por 20 minutos com uma troca nos primeiros 10 minutos. A inclusão em blocos de paraplast aconteceu após um período de impregnação de três horas em estufa. A coloração utilizada foi a de Hematoxilina-Eosina (HE). Foram feitos cortes seriados, obtidos através de um micrótomo MICROM modelo HM 325 com espessura de 3 µm da região sagital mediana do animal em processo regenerativo. Foi estudada histologicamente a região cefálica regenerada a partir do fragmento corpo. Na região regenerada foi quantificada a presença de neoblastos.

Para a quantificação de neoblastos foi selecionado um campo da área em regeneração na imagem do corte histológico obtida por câmera de vídeo CCD e registrada pelo software LEICA QWIN®, utilizando-se a objetiva de maior aumento (x100). Essa análise foi realizada em cada grupo estudado, até o terceiro dia de regeneração.

## Resultados

Os resultados obtidos para a contagem de neoblastos para os 3 primeiros dias de regeneração estão mostrados na figura 4. Os pontos experimentais para o grupo controle estão unidos por uma linha do tipo *spline*. A curva relativa aos dados do grupo irradiado corresponde a uma exponencial simples.

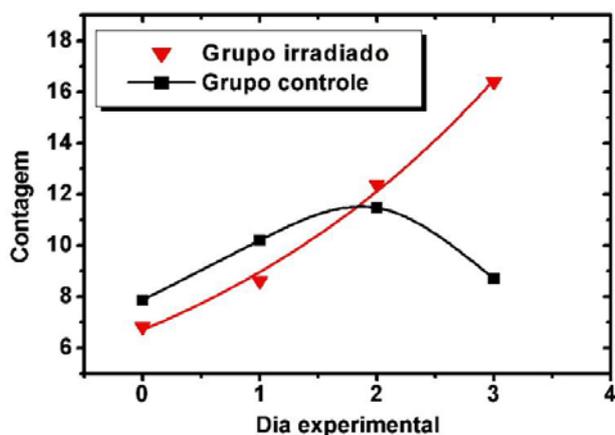


Figura 4: Resultados obtidos para a contagem de neoblastos para os 3 primeiros dias de regeneração.

## Discussão

A análise da figura 4 mostra que a dinâmica de proliferação de neoblastos em *Dugesia tigrina* apresenta grande diferença quando os espécimes são submetidos à ação da radiação laser em 660 nm. Enquanto no grupo controle ocorre um aumento inicial na contagem, atinge um máximo no dia 2 de experimentação e regride no dia 3, no grupo irradiado observa-se um contínuo aumento em todo o período estudado. No atual momento da pesquisa não se tem ainda uma explicação para a reversão da curva de proliferação celular para o grupo não submetido à radiação laser. Estudos adicionais são necessários para dar suporte a quaisquer hipótese que possa ser feita.

É interessante observar que a curva de proliferação celular para o grupo irradiado segue um modelo exponencial de crescimento, com os seguintes parâmetros de ajuste de curva:  $\chi^2=0.226$  e  $R^2=0.9958$ .

O único relato científico, de conhecimento dos autores, relatando os efeitos da radiação laser na proliferação de células tronco em planárias aponta uma contagem celular máxima no quarto dia experimental (SOUZA et al., 2005). Entretanto, como no referido trabalho o intervalo experimental entre as análises foi longa e apenas em 3 dias experimentais (3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 15<sup>o</sup> dias), ainda não existe uma exata determinação do dia em que ocorre a máxima resposta proliferativa. O presente trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica de proliferação de neoblastos apenas no estágio inicial de regeneração tecidual. Trabalhos

estão em andamento em nosso grupo no sentido de melhor determinar o tempo para máxima resposta proliferativa destas células indiferenciadas.

## Conclusão

Em conclusão, a dinâmica de proliferação de células - tronco em planárias *Dugesia tigrina* foi determinada para o estágio inicial do processo regenerativo. Os resultados indicaram que o laser induz um crescimento exponencial na quantidade de células na região sob regeneração, durante o período estudado (até o terceiro dia após amputação dos espécimes).

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Proc. 2001/12754-2), à MM Optics Ltda, por ter disponibilizado o laser para este trabalho, à Profa Cibelle Barbosa Lopes pela leitura crítica do manuscrito, bem como o apoio técnico oferecido pela Dra. Profa Emília Angela Loschiavo Arisawa.

## Referências

- ABERGEL, R. P.; LYONS, R. F.; CASTEL, J. C.; DWYER, R. M. UITTO, J. Biostimulation of wound healing by lasers: Experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J Dermatol Surg Oncol**, v.13, n.2, p.127-133, 1987.
- ALMEIDA- LOPES, L. et al. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 29, p. 179-184, 2001.
- ALVARADO, A. S.; NEWMARK, P. A.; ROBB, S. M. C.; JUSTE, R. The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying plathelminthes, stem cells and regeneration. **Development**, v.129, p.5659-5665, 2002.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>
- BAGUNÀ J, SALÓ E, AULADELI C. 1989. Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. **Development** 107:77-86

CANDIDO LC: **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora SENAC-SP, 2001.

KARU, T.I; Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics** QE-23, V.10, p.1703-1717, 1987.

KELLER J. 1894. Die ungeschlechtliche Fortpflanzung der Süßwasser-Turbellarien. **Jen Zeit Naturw.** 28:370–407.

LEHNERT GH. 1891. Beobachtung an Landplanarien. **Arch. Naturgesch.** 1:306–50.

LOPES, C. B; PINHEIRO, A.L.B; SATHAIAH, S. Duarte, J; MARTINS, M.C. Infrared laser light reduces loading time of dental implant: A Raman spectroscopy study. **Photomedicine and Laser Surgery** 23(1), 27–31, 2005.

MESTER, A.F; MESTER, A. Wound Healing. **Laser Therapy**. V. I, n. 1, p. 7, 1989.

ROCHA J. C. T., Laser therapy, tissue cicatrization and angiogenesis **Revista Brasileira em Promoção da Saúde** Vol: 17 Issue: 1 Pages/record No.: 44-18 ,(2004).

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.

SOUZA, S.C. , E MUNIN, L P ALVES, M A C SALGADO, M T T PACHECO Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration **J Photoch Photobio B: Biology** 80 (2005) 203–207.

WAGNER Fv. 1890. Zur Kenntnis der ungeschlechtlichen Fortpflanzung von *Microstoma* nebst allgemeinen Bemerkungen über Teilung und Knospung im Tierreich. **Z. Jahrb.** 4:349–423.

WEISS, N. e ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat. Embryol**, V. 186, p. 497-503, 1992.

YU W., NAIM J.O. , LANZAFRAME R.J. “ The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF-beta, PDGF and bFGF from fibroblasts in vitro”, **Lasers Surg Med**; v.6, n.Suppl, p.8 (1994).