

ESTUDO DA REPARAÇÃO EPITELIAL DA CÓRNEA DE COELHO SUBMETIDO A FOTOESTIMULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

João Artur Etz Junior^{1,2}, Kátia Calligaris Rodrigues², Janaína Duarte², Neila Maria Rocha Garcia², Newton Soares da Silva², Renato Amaro Zângaro²

¹- Universidade Comunitária de Chapecó – UNOCHAPECÓ/ Pós-Graduação, Av. Senador Atílio Fontana, 591 – E, Bairro Efapi, Cx Postal 747, Chapecó – SC – Cep 89809-000 - jartur@desbrava.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – São José dos Campos – SP – Cep 12244-000, kalligaris@gmail.com

Resumo- Os efeitos de biomodulação com laser de baixa potência, tanto para reparação tecidual como agente antiinflamatório têm sido amplamente estudados e divulgados, entretanto, até o momento não foi encontrado um estudo específico no tratamento corneano. No intuito de contribuir com esta linha de pesquisa, este trabalho apresenta resultados preliminares de experimento realizado em 06 coelhos machos, da raça Nova Zelândia, separados em dois grupos de 03 animais. Primeiramente foram desepitelizadas as córneas de todos os animais utilizando-se um micromotor, um grupo foi submetido a fotoestimulação diária de 1,5 J/cm² com laser de baixa potência num comprimento de onda de 650nm, e o outro grupo não recebeu nenhum estímulo bioreparador, por um período de 05 dias. Nesse período todos os animais receberam o mesmo tratamento antiinflamatório e analgésico com colírios e foram fotografados diariamente com a ajuda de um marcador para evidenciar a região desepitelizada. Por meio do software Leica Q-Win, foi possível mensurar o diâmetro de córnea desepitelizada, cujos resultados apresentam um potencial aumento na velocidade de epitelização em função do tratamento com fotoestimulação.

Palavras-chave: fotoestimulação, biomodulação, reepitelização de córnea, laser de baixa potência
Área do Conhecimento: Engenharias

Introdução

O emprego do laser constitui-se em um dos recursos utilizados em cirurgias de córneas com o objetivo de correção de ametropias (correção de erros de refração). No entanto, a utilização do laser de baixa potência, especificamente, em tratamento corneano não encontra respaldo científico. Todavia os efeitos de biomodulação com a aplicação de laser de baixa potência estão cada vez mais evidentes (VLADIMIROV et al., 2004), em reparação de feridas (RABELO et al., 2006), na reparação de osso (NICOLAU et al., 2003) e como agente antiinflamatório (ALBERTINI et al., 2007).

O tipo de resposta induzida pela aplicação do laser associa-se às características dosimétricas da radiação utilizada (comprimento de onda e densidade de potência). A radiação no vermelho e no Infra Vermelho são as mais usadas, pois apresentam baixa absorção pela hemoglobina e podem penetrar mais profundamente no tecido biológico vivo (VLADIMIROV et al., 2004).

Os efeitos de regeneração e vasodilatação observados na aplicação do laser (VLADIMIROV et al., 2004) levaram a proposta desse trabalho no sentido de verificar a reparação epitelial corneana em coelhos. Os resultados preliminares obtidos apresentam um significativo crescimento epitelial em função da radiação laser.

Materiais e Métodos

Nesse experimento foram utilizados 6 coelhos machos Nova Zelândia, pesando de 0,8 à 1kg, divididos em dois grupos, 3 animais no grupo controle e 3 animais no grupo fotoestimulado. Os dois olhos de cada animal foram utilizados no experimento.

Para realizar o processo de desepitelização da córnea os animais foram anestesiados com Butorfanol 0,5mg/kg, em seguida foram aplicados 40mg/kg (0,4ml/kg) de Ketamina (Syntec) e 8mg/kg (0,4ml/kg) de Xilazina (Syntec). Como anestésico local foi utilizado o Anestalcon® (Cloridrato de proximetaina 0,5%), 1 gota por olho antes da desepitelização. Com os animais sedados a desepitelização foi realizada utilizando um marcador de zona óptica de $\phi = 6,5$ mm e um micromotor. Para visualização do processo, foi utilizado um estereoscópio (Edmund Scientific Co.).

Todos os animais foram fotografados logo após a desepitelização 0h, 24h após, 48h, 72h e 96h com uma câmara de vídeo digital (JVC – TKC1480E) acoplada à um microcomputador, para evidenciar a região desepitelizada foi utilizada a fluoresceína colírio. As imagens foram coletadas com o software Leica Q-Win.

O Acular® (cetorolaco de trometamina 0,5%) e o Zymar® (gatifloxacino 0,3% - cloridrato) foram ministrados em todos os animais após a desepitelização, 1 gota em cada olho, três vezes ao dia até o abate.

Os animais do grupo fotoestimulado foram irradiados com um laser de diodo (Microdont), em 650 nm, potência de 40 mW, tempo de irradiação de 60s, diâmetro de irradiação de 1,4 cm e fluência de 1,5J/cm². Foram realizadas irradiações em 0h, 24h, 48h, 72h e 96h. Para miose, 2 gotas por olho de Pilocarpina® (Cloridrato de pilocarpina 4%), foram aplicadas antes da irradiação.

Resultados

As fotos digitais, obtidas diariamente logo após a irradiação laser, foram analisadas com a ajuda do software Leica Q-Win. Por meio desse software é possível medir o diâmetro de córnea desepitelizada. A fluoresceína, aplicada no olho do animal antes da obtenção da imagem digital, permitiu o reconhecimento da região desepitelizada, como apresentado na figura 1.

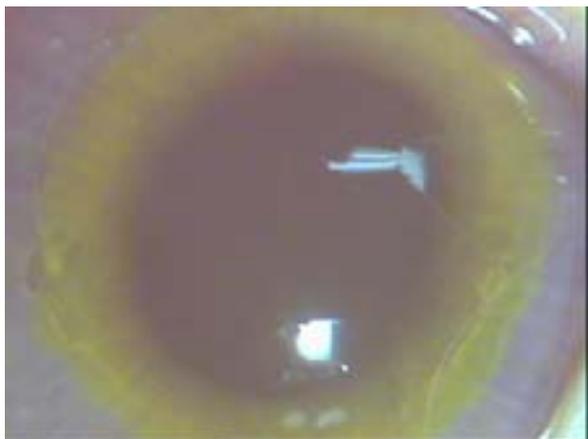


Figura 1- Córnea de coelho desepitelizada e marcada com fluoresceína.

Por meio do software Leica Q-Win, é possível mensurar o diâmetro de córnea desepitelizada marcada com a fluoresceína. Os valores médios obtidos para o diâmetro desepitelizado, tanto nos animais fotoestimulados, como nos animais controle, para os tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h são apresentados no gráfico da figura 2.

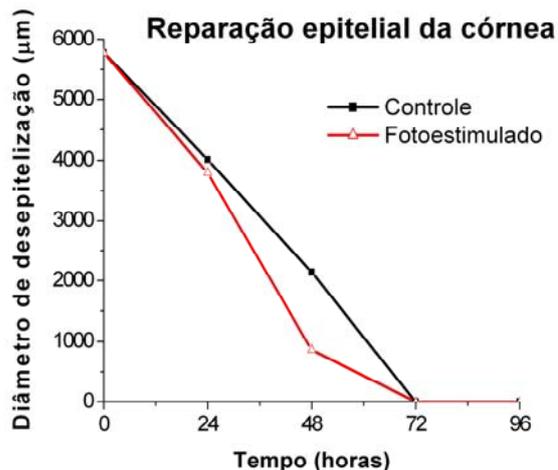


Figura 2- Medida do diâmetro desepitelizado

Discussão

De forma simplificada, no processo de regeneração epitelial da córnea, células epiteliais superficiais seriam constantemente liberadas no filme lacrimal e simultaneamente substituídas por células que se movem anteriormente das camadas basais do epitélio que, por sua vez, seriam repostas por outras células basais que movimentam-se centripetamente do limbo. Esse conceito foi proposto por Thoft & Friend (1983) na hipótese do X, Y e Z e foi comprovado por uma série de observações e experimentos. X representa a proliferação e diferenciação verticalizada das células epiteliais basais (CAT→CPM→CDT); Y é a proliferação e migração centripeta das células epiteliais límbicas (CAT); e Z representa a perda celular epitelial da superfície. Para que um estado de equilíbrio seja mantido, é necessário que X + Y resulte em Z. As células epiteliais das camadas basais e suprabasais movem-se centripetamente a uma velocidade de 26 µm/dia (GOMES & ALVEZ, 2005). Estima-se que o epitélio seja constantemente renovado a cada 7-10 dias.

Quando ocorre desequilíbrio na equação X+Y=Z, como no caso de uma abrasão corneal, inicia-se o processo de cicatrização ou reparação epitelial. Resumidamente, pode ser definido como a amplificação do processo de regeneração fisiológico que envolve eventos celulares e sub-celulares, sob a influência de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento.

Pode ser dividido em três componentes principais: migração, proliferação e adesão epitelial. Os três componentes são interdependentes e ocorrem simultaneamente, porém a contribuição de cada um varia de acordo com a área, profundidade e causa da lesão.(GOMES & ALVES, 2005).

A responsividade das células à radiação deve-se a absorção seletiva de seus fótons por estruturas celulares denominadas de cromóforos (fotorreceptores não especializados). Esses fotorreceptores representam, obrigatoriamente, elementos constituintes de vias bioquímicas celulares específicas, que não dependem da luz. Assim, com a absorção dos fótons aportados pela radiação, as moléculas adquirem um estado eletronicamente excitado (mudança do potencial redox), causando influência na regulação cinética da respectiva via bioquímica. Esta alteração focal serve como um gatilho para uma série de alterações bioquímicas em cadeia que culminam em uma mudança das funções proliferativas de uma célula (KARU, 1998).

Pesquisas recentes denotam que entre os cromóforos fotorreceptores mais efetivos estão as proteínas que constituem a cadeia de transportadores da membrana mitocondrial interna. Há, ainda, estudos comparativos entre os espectros de ação da TLBI e os espectros de absorção dos constituintes desta cadeia que indicam mais especificadamente para os componentes do complexo enzimático citocromo-oxidase (KARU, 1998).

Destaca-se que a absorção dos fótons pelos componentes da cadeia respiratória levaria a um aumento do seu potencial redox. Esta configura-se como a hipótese mais aceita da ação da radiação laser. Assim, em resposta a esse aumento seria estabelecido um maior gradiente eletroquímico de prótons transmembrana mitocondrial, responsável, por sua vez, por um aumento na síntese do ATP e pelo aumento da concentração hidrogênica no citoplasma celular (KARU et al. 1995). A acidificação do meio intracelular induz a alterações na permeabilidade da membrana celular aos íons sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cálcio (Ca²⁺), alterando suas concentrações citosólicas. As concentrações alteradas destes íons mono e divalentes são capazes de alterar o metabolismo dos nucleotídeos cíclicos, particularmente 3'5-monofosfato de adenosina (AMPc), no controle do metabolismo e proliferação celular (WHITFIELD et al., 1980; BOYNTON & WHITFIELD, 1983; KARU, 1998; KARU, 1998b).

Vias alternativas cuja participação também foram sugeridas no contexto dos mecanismos de ação da TLBI envolvem mudanças nos aspectos conformacionais e funcionais dos cromóforos fotorreceptores em resposta ao discreto aquecimento local, e na produção, pelas mitocôndrias, de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pela absorção dos fótons (GROSSMAN et al., 1998).

Entre as respostas biológicas decorrentes das alterações bioquímicas celulares induzidas pela TLBI, pode-se citar o aumento nas taxas de proliferação celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001),

aumento nas taxas de síntese de proteínas, extra-síntese de ATP (PASSARELA et al., 1984), influência sobre o processo de diferenciação celular (BEN-DOV et al., 1999) e síntese e liberação de moléculas biologicamente ativas, tais como citocinas (YU et al., 1996) e fatores de crescimento.

Pode-se dizer que essas alterações fisiológicas são atributo da TLBI de estimular o processo de reparo dos tecidos biológicos, assim como para o tecido ósseo (BARUSHKA et al., 1995), tendíneo (REDDY et al., 1998), epitelial (AL WATBAN et al., 1997).

Conclusão

Os resultados obtidos nesse experimento corroboram outros resultados da literatura no que tange ao efeito de biomodulação tecidual observado nos animais irradiados.

Nesse experimento observou-se que o crescimento epitelial da córnea se desenvolve mais rapidamente nos animais irradiados que nos animais controle.

A seqüência do estudo prevê a análise histológica para avaliar a qualidade do crescimento epitelial.

Referências

- ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.; VILLAVARDE, A.B.; SILVA, J.A. Jr.; COSTA, M.S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. **Inflamm Res.** V.56, n.6, p.228-9, 2007.
- ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZANGARO, R.A.; GUINDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Laser Surg Med.** V.29, p.179-84, 2001.
- AL-WATBAN, F.A.H., ZHANG, M.D. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. **J Clin Laser Med Surg.** V. 15, n.5, p.209-15, 1997.
- BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone.** V.16, P.47-55, 1995.
- BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochem Biophys Acta.** V.1448, p. 372-380, 1999.

- BOYNTON, A.L.; WHITFIELD, J.F. The role cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. In: GREENGARD, P.G.; ROBINSON, G.A. **Advances in cyclic nucleotid research**. New York: Raven Press, 1983.
- GOMES, J.A.P.; ALVES, M.R. (Org.). **Superfície ocular: córnea, limbo, conjuntiva, filme lacrimal**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005.
- GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**. V.22, p.212-18, 1998.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of the action of monochromatic visible and near infrared radiation on cell. In: **The science of low-power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Publishers, 1988.
- KARU, T. Basis of the action of monochromatic visible and near infrared radiation on cell. In: **The science of low-power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Publishers, 1988b.
- KARU, T.; PYATTIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increased ATP level in cells cultivated *in vitro*. **J. Photochem Photobiol B: Biol**, V. 27, p.219-23, 1995.
- NICOLAU, R.A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; DOS REIS, L.M.; ZÂNGARO, R.A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Laser Med Sci**. V.18, n.2, p.89-94, 2003.
- PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, J.M.; CATALANO, J.M.; CINGOLANI, A. A increase of proton electro-chemical potencial and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **FEBS Let**. V.175, p.95-9, 1984.
- RABELO, S.B.; VILLAVERDE, A.B.; NICOLAU, R.A.; SALGADO, M.A.C.; MELO, M.D.; PACHECO, M.T.T. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**. V.24, n.4, p.474-479, 2006.
- REDDY, G.K.; STEHNO-BITEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendon. **Lasers Surg Med**. V.22, p.281-287, 1998.
- THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z, hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. V.24, p.1442-3. 1983.
- VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)**. V.69, n.1, p.81-90, 2004.
- WHITFIELD, J.F.; BOYNTON, A.L.; McMANUS, J.P.; NIXON, R.H.; SIROSKA, M. TSNAG, B.; WALKER, P.R.; SWIERENGA, G.H.H. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. **Ann NY Acad Sci**. V.339, p.216-240, 1980.
- YU, H.S.; CHANG, K.; YU, C.L.; CHEN, J.; CHEN, G. Low-energy Helium-Neon laser irradiation stimulates interleuciu-1 α and interleucin-8 release from cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol**. V.107, p.593-596, 1996.