

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO INFRA-VERMELHA PRODUZIDA POR CERÂMICA TERMOLUMINESCENTE EM ORGANISMOS VIVOS

Neila Maria Rocha Garcia¹, Allison Gustavo Braz¹, Leandro Procópio Alves¹, Luis Augusto Lupato Conrado, Egberto Munin¹

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

neilarocha_sjc@yahoo.com.br, fisiobraz@hotmail.com, leandro@univap.br, munin@univap.br

Resumo- As planárias de água doce têm se apresentado como excelente modelo para estudo do processo de regeneração tecidual devido às suas características regenerativas. Este trabalho tem com objetivo avaliar o processo regenerativo de plânarias, da espécie *Dugesia tigrina*, no seu quarto dia regenerativo, na presença de tecidos impregnados com biocerâmica Invel. As planárias (n=32) foram seccionadas transversalmente na região entre cabeça e corpo, e divididos igualmente em dois grupos experimentais, um grupo controle e um grupo com cerâmica Invel. Após completado o período de 96hs procedeu-se a fixação de todas as amostras em solução de Bouin, e a coloração com hematoxilina - eosina, para posterior contagem dos neoblastos por estereologia..

Palavras-chave: Neoblastos, biocerâmica, planárias, infravermelho longo.

Área do Conhecimento: ENGENHARIAS

Introdução

Enquanto a maioria dos cientistas procura compreender os mecanismos da regeneração em animais tradicionais de laboratório, alguns pesquisadores estudam os animais que podem regenerar de fato. Dentre eles, as planárias de água doce têm se apresentado como excelente modelo devido às suas características regenerativas, cujos mecanismos de modelação, ao contrário da maioria dos outros animais estão presentes em todo ciclo vital.

O conhecimento da regeneração de partes perdidas ou danificadas é de fundamental importância para a compreensão e controle deste processo e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da engenharia tecidual, medicina regenerativa, biotecnologia entre outras.

Sanchez Alvarado e outros que trabalham na regeneração natural em organismos vivos, tais como em planárias, argumentam que provas moleculares obtidas a partir de suas pesquisas podem ajudar cientistas a tentarem desenvolver terapias em célula humana.

O tipo de célula mais peculiar nas planárias são as células totipotentes, chamadas neoblastos (células-tronco). Elas são as únicas células dotadas da capacidade de se dividir e diferenciar em qualquer tipo de célula de uma planária adulta, sendo assim responsáveis pelas habilidades regenerativas das planárias. Em resposta a um ferimento são sinalizados para divisão e/ou diferenciação, substituindo assim as células e tecidos perdidos. Os neoblastos possuem um grande núcleo e muito pouco citoplasma

Além dos neoblastos, outro aspecto que chama a atenção para as pesquisas em planárias, é que, embora sendo organismos simples, possuem funções fisiológicas completas tais quais sistema nervoso central, sistema digestivo e um sistema reprodutor hermafrodita complexo, tal como foi detalhado por Saló (2006).

Os neoblastos constituem 25-30% de todas as células das planárias (BAGUÑA et al. 1989) e podem se diferenciar em epiderme (SKAER 1965, HORI 1983a, EHLERS 1992, NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO 2000), *rhabdite cells* (LENTZ 1967, HORI 1978), músculos (SAUZIN 1967, HORI 1983b, MORITA & BEST 1984), neurônios e células germinativas (GREMIGNI 1974), entre outros.

A empresa INVEL, através de pesquisas, conseguiu incorporar uma biocerâmica em polímeros a tecidos de algodão, poliamida e elastano de forma que possibilitasse o desenvolvimento de acessórios terapêuticos.

Este tipo de biocerâmica incorporada aos tecidos pela empresa são termoativos, ou seja, o tecido impregnado com a biocerâmica em contato o próprio calor do corpo é ativada, emitindo radiação infravermelha longa.

A radiação emitida pela cerâmica termoativa está na região do infravermelho longo (IVL), entre 3 e 15 µm. Efeitos terapêuticos têm sido atribuído à este tipo de material quando aplicado de forma tópica (GORDON, BERBRAYER, 2002; RAO, PAABO, GOLDMAN, 2004).

Dentre os materiais que vem surgindo no mercado como potenciais irradiadores de IVL, destacam-se notadamente as cerâmicas

covalentes e alguns derivados de óxidos cerâmicos puros.

Este trabalho tem com objetivo avaliar o processo regenerativo de plânrias no seu quarto dia regenerativo, quando na presença de tecidos impregnados com biocerâmica Invel.

Metodologia

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofotônica e Óptica não linear do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP - São José dos Campos.

As amostras da espécie *Dugesia tigrina* foram coletadas de raízes de plantas aquáticas de água doce do Rio Paraíba em São José dos Campos-SP. Um total de 32 animais com comprimento na faixa entre 0,5 e 1,5 cm e com perfeita morfologia foram selecionadas, sendo descartados aquelas em que apresentassem qualquer tipo de fragmentação do corpo ou indício de regeneração anterior aos experimentos. Os espécimes foram mantidos em laboratório com temperatura ambiente e alimentados com comida de peixe três vezes por semana. A alimentação foi suspensa uma semana antes do seccionamento dos animais.

Com o auxílio de um pincel, cada animal foi colocado em um dispositivo de resfriamento, desenvolvido no laboratório, sobre um papel filtro umedecido com água, para proceder o anestesiamento e posterior seccionamento transversal no terço proximal à cabeça, com um bisturi, tal como indicado na Figura 1.

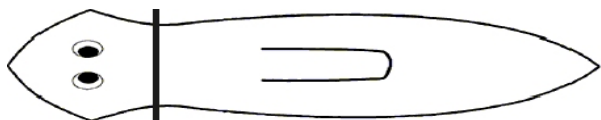


Figura 1: Representação esquemática do local do corte.

Após a amputação, cada animal foi colocado em uma placa de petri e randomicamente divididos em dois grupos experimentais, um grupo controle (GC) e um grupo com cerâmica Invel (GI). O GC foi envolvido em um tecido negro não impregnado com biocerâmica e o GI foi envolvido em um tecido negro, impregnado por biocerâmica Invel.

Durante o período experimental as amostras não sofreram manipulação, foram mantidas em ambiente com temperatura e umidade controlada e ausência de luz. Após completado o período de 96hs, procedeu-se a fixação de todos os animais em solução de Bouin para posterior processamento histológico de desidratação e inclusão em Paraplast.

Com os blocos cortados com 3 μm de espessura (os cortes foram realizados no plano sagital dos animais) e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE), foi iniciada a captura das imagens. As lâminas eram colocadas em um

microscópio (Leica) equipado com uma câmera digital (Leica DFC280) com 17,5x de magnificação acoplada a um microcomputador, mostrando em tempo real a imagem observada no microscópio na tela do computador. Todas as imagens foram capturadas de forma padronizada com objetiva de imersão (100x) pelo software Image Manager 50 (Leica), assim que a imagem da amostra era posicionada no local designado para a captura, na região medial e dianteira de cada planária.

Para a análise quantitativa dos neoblastos, foi utilizada uma técnica estereológica, pois a estereologia permite fazer relações de estruturas que possuem 3 dimensões (neoblastos) em materiais com 2 dimensões (suas respectivas lâminas histológicas, neste caso com 3 μm de espessura), tal como Russ e Dehoff (1999) e Mandarim-de-Lacerda (2003) comentam.

Neste trabalho foi utilizado um sistema-teste composto por um quadro com área de 660 μm^2 , utilizado para quantificar a densidade de perfis por área-teste, e por 36 pontos eqüidistantes (Figura 2), utilizados para determinar a ocupação relativa da estrutura na área-teste.

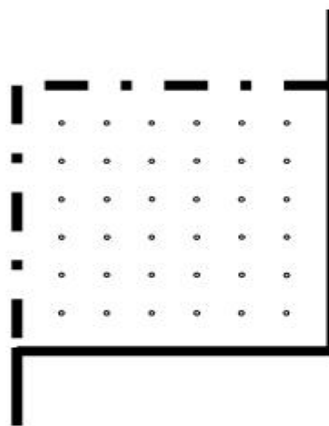


Figura 2 – Sistema utilizado na quantificação cercado por 2 linhas contínuas e 2 linhas descontínuas (linha proibida). Todo neoblasto que toca a linha proibida, não é contabilizado.

O sistema-teste foi calibrado sobre a imagem de uma graticula micrometrada fotografada nas mesmas condições de aquisição das imagens das amostras. Após calibragem, o sistema-teste foi sobreposto às imagens sendo que todas as medidas foram tiradas em 15 campos por animal, tal como mostra a figura abaixo (Figura 3).

Resultados

Com os resultados obtidos com a quantificação pela estereologia, foi possível observar os percentuais das densidades de volume (Vv) de neoblastos, músculos, intestino e interstício celular.

A Tabela 1 mostra as médias dos grupos GC e GI.

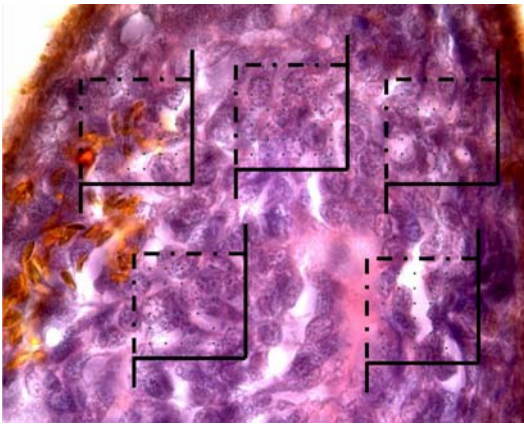


Figura 3 – Foto de um corte de uma planária (3 μ m) sob a objetiva de 100X, mostrando o enquadramento do sistema-teste sobreposto à imagem, utilizado para a quantificação dos neoblastos.

Tabela 1 – Valores médios dos volumes quantificados pela estereologia nas planárias do experimento.

Vv	GC	GI
Neoblastos	36,61%	40,11%
Músculos	2,46%	2,38%
Intestino	9,62%	8,80%
Interstício	51,32%	48,71%

Os gráficos das Figuras 4 e 5 mostram estatisticamente os resultados obtidos. A Figura 4 mostra o gráfico comparativo entre os grupos GC e GI dos neoblastos e interstício, que são os dois tecidos mais abundantemente observados microscopicamente nos animais.

A Figura 5 compara graficamente os tecidos musculares e intestinais dos grupos GC e GI, que são os dois tipos de tecido que foram menos observados nos animais.

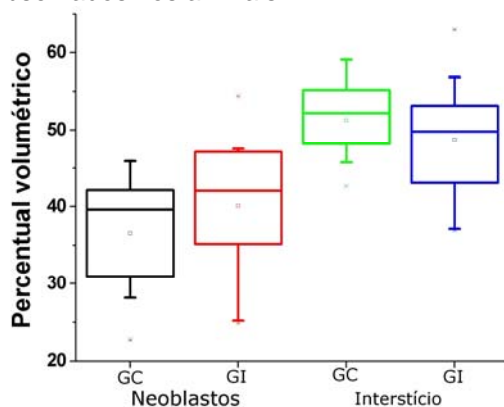


Figura 4 – Gráfico mostrando os resultados em porcentagem da dimensão atingida pelos tecidos analisados de cada grupo. O box em vermelho mostra um discreto aumento dos neoblastos no grupo GI.

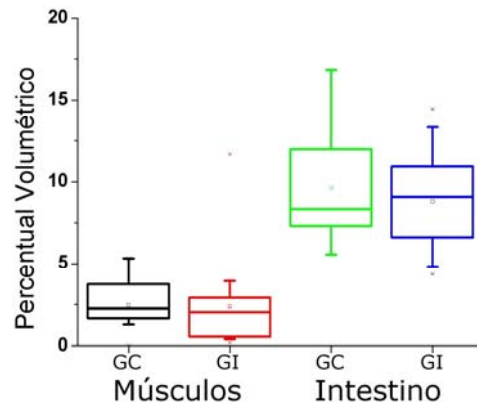


Figura 5 – Comparação entre os grupos GC e GI em relação aos tecidos musculares e intestinais dos animais. Não houve diferença entre os grupos.

Discussão

Embora o GI tenha apresentado um melhor resultado na quantificação de neoblastos não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos no nível de significância $p=0,05$ (Anova). As outras quantificações apresentaram uma diferença ainda mais sutil entre grupos.

Apesar da existência de relatos clínicos apontando eficiência terapêutica das assim chamadas biocerâmicas (GORDON, BERBRAYER, 2002; RAO, PAABO, GOLDMAN, 2004), o presente trabalho não acusou alterações na quantificação celular de neoblastos em planárias expostas ao tecido com biocerâmica incorporada. Este resultado pode ser devido ao fato de termos escolhido um organismo aquático para o experimento, embora com este mesmo organismo já foi relatado que a radiação óptica no espectro visível produz alterações celulares mensuráveis (Souza et al, 2005, Munin et al 2007). Deve-se, neste caso, considerar que a água não atenua de forma significativa a radiação visível, mas absorve fortemente o infra-vermelho médio e longo, faixas de emissão da assim denominada biocerâmica. Como os animais foram mantidos em placas de Petri imersos em água, é possível que o corpo do animal não tenha sido exposto à radiação de forma suficiente para que qualquer efeito estatisticamente significativo tenha sido produzido. No experimento, foram colocados tecidos impregnados com biocerâmica sob e sobre a placa de Petri. Para chegar até o corpo do animal, a radiação IVL eventualmente gerada pelo tecido situado debaixo da placa de Petri, além da água em que o animal estava imerso, estava também submetida à espessura do próprio vidro, provavelmente tipo borossilicato, o qual apresenta

também forte absorção nas regiões do infravermelho médio e longo.

Um aspecto relevante que deve ser mencionado é que os relatos na literatura se referem a seres humanos. Com aplicações tópicas nas quais os tecidos ficam em contato com o corpo, as biocerâmicas ficam submetidas à temperatura corpórea de 36,6°C, aumentando a eficiência de emissão das mesmas. As planárias são organismos sensíveis, não tendo sido possível elevar a temperatura além da temperatura ambiente do laboratório (-22 °C). Com a temperatura mais baixa, é de se esperar uma eficiência de emissão reduzida.

Conclusão

Neste experimento, não foi possível observar alterações significativas em planárias expostas a tecidos incorporados com cerâmicas termo-ativas. Entretanto, considera-se que o experimento não foi conclusivo quanto à comprovação dos efeitos da biocerâmica em organismos vivos, devido a interferências experimentais diversas.

Referências

- ALVARADO, A.S. Regeneration in the metazoans: why does it happen? **BioEssays** 22, 578-590, 2000.
- BAGUNÀ J, SALÓ E, AULADELI C. Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. **Development** 107, 77-86, 1989.
- EHLERS, U. No mitoses of differentiated epidermal cells in the platyhelminthes: mitosis of intraepidermal stem cells in *Rhyncoscolex simplex* Leidy 1851 (Catenulida). *Microfauna Marina* 7, 311-21, 1992.
- GREMIGNI V. The origin and cytodifferentiation of germ cells in the planarians. **Boll. Zool.** 41, 359-77, 1974.
- HORI I. Possible role of rhabdite-forming cells in cellular succession of the planarian epidermis. **J. Electron Microsc.** 27, 89-102, 1978.
- HORI, I. Cytological studies on rhabdite formation in the planarian differentiating cells. **J. Submicrosc. Cytol.** 15, 483-94. 1983a.
- HORI, I. Differentiation of myoblasts in the regenerating planarian *Dugesia japonica*. **Cell Differ.** 12:155-63, 1983b.
- KO G.D., and BERBRAYER D. Effect of Ceramic-Impregnated "Thermoflow" Gloves on Patients with Raynaud's Syndrome: Randomized, Placebo-Controlled Study. **Alternative Medicine Review** 7(4), 328-335, 2002.
- LENTZ T.L. Rhabdite formation in planaria: the role of microtubules. **J. Ultrastruct. Res.** 17:114-26, 1967.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences.** V.2, n.75, p.469-486, 2003.
- MORITA M., BEST J.B. Electron microscopic studies of planarian regeneration. III. Degeneration and differentiation of muscles. **J. Exp. Zool.** 229:413-24, 1984.
- MUNIN E; GARCIA N.M.R.; BRAZ A.G.; SOUZA S.C.; ALVES L.P.; SALGADO M.A.C.; PILLA V. The use of planarians as in vivo animal model to study laser biomodulation effects. **Optical Interactions with Tissue and Cells XVIII**, S L. Jacques; W P. Roach, Editors, Vol 6435 DOI 10.1117/12.701304
- RAO J., PAABO K.E., GOLDMAN M.P. A double-blinded randomized trial testing the tolerability and efficacy of a novel topical agent with and without occlusion for the treatment of cellulite: a study and review of the literature. **J. Drugs Dermat.** 3(4) 417-425, 2004.
- RUSS, J.C. DEHOFF, R.T. **Practical Stereology.** 2 ed. New York, NY. Ed Plenum, 1999.
- SALÓ, E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). **BioEssays** 28:546-559, 2006. SAUZIN M. Etude ultrastructurale de la differentiation du neoblaste au cours de la regeneration de la planaire *Dugesia gonocephala*. **Bull. Soc. Zool.** 92:313-18, 1967.
- SKAER R.J. The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Ijima). **J. Embryol. Exp. Morphol.** 13:129-39, 1965.
- SOUZA S.C., MUNIN E., ALVES L.P., SALGADO M.A.C., PACHECO M.T.T. Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration. **J Photoch Photobio B: Biology** 80, 203-207, 2005.