

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA HE NE EM FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS

Ana Paula Inoe¹
 Carla Cristina Garcia Zafaneli²
 Rafael Menegatt Rossato²
 Marshal Costa Leme³
 Adrien Wihelm Dilger Sanches³
 Cláudio Vieira Araújo⁴
 Simone Inoe Araújo⁵

INOE¹, A. P.; ZAFANELLI², C. C. G.; ROSSATO², R. M.; LEME³, M. C.; SANCHES³, A. W. D.; ARAÚJO⁴, C. V.; ARAÚJO⁵, S. I. Avaliação Morfológica do Efeito do Laser de Baixa Potência Hene em Feridas Cutâneas de Coelhos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 27-30, jan./jun. 2008.

RESUMO: Foram utilizados nove coelhos hígidos, machos, adultos, com o objetivo de estudar os aspectos morfológicos da cicatrização de feridas cutâneas cirurgicamente produzidas e tratadas com a radiação laser de baixa potência HeNe. Foram induzidas três lesões limpas, na região torácica dorsal, mediante a utilização de “punch” dermatológico de 1 cm, com distância de, pelo menos, 10 cm entre cada lesão. As lesões foram diariamente radiadas com 3 ou 6 J/cm² e a lesão restante não foi radiada. As feridas foram diariamente mensuradas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico. Os coelhos foram separados em 3 grupos, para biópsia, no 7^o, 14^o e 21^o dias de pós-operatório. Não se observou diferença no padrão cicatricial em relação aos tratamentos nos diferentes dias de observação, quanto ao tamanho e aspecto da lesão, formação de fibras colágenas, neoformação de vasos e reepitelização completa da epiderme. Tais resultados podem ter ocorrido em decorrência do efeito sistêmico da terapia laser de baixa potência.

PALAVRAS – CHAVE: Cicatrização de Feridas. Laser. HeNe. Coelhos

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECT OF LOW POWER HE-NE LASER ON CUTANEOUS WOUNDS IN RABBITS

ABSTRACT: Nine healthy, male, adult rabbits were used to study the morphological aspects of surgically induced cutaneous wounds treated with low power He-Ne laser therapy. Three clean wounds were bilaterally induced in the dorsal cranial thoracic region by using a 1-cm dermatological punch, with distance of 10 cm among each injury. The wounds were daily radiated with either 3 or 6 J/cm². The remaining injury was not radiated. The wounds were daily measured and evaluated for their macroscopic aspect. Rabbits were separated into 3 groups for biopsy at the 7th, 14th, and 21st days after surgery. No statistical difference in cicatricial pattern was observed with respect to the treatments on different observation times in relation to the size and evolution of the wound, collagen fiber formation, vessel ingrowth and total reepithelialization of the epidermis. Such results can be explained due to the systemic effect of the low power laser therapy.

KEYWORDS: Wound Healing. Laser. HeNe. Rabbits.

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO DEL LÁSER BAJA POTENCIA HENE EN HERIDAS CUTÂNEAS DE CONEJOS

RESUMEN: Nueve conejos sanos, machos y adultos, fueron utilizados, con el objetivo de estudiar los aspectos morfológicos de la cicatrización de heridas cutâneas quirúrgicamente producidas y tratadas con radiación láser de baja potencia HeNe. Tres lesiones limpias fueron inducidas en la región dorsal del tórax, por medio del uso de “punch” dermatológico de 1 centímetro, con distancia de por lo menos 10 centímetros entre cada lesión. Las lesiones fueron diariamente radiadas con 3 o 6 J/cm² y la lesión restante no fue radiada. Las heridas fueron mensuradas y evaluadas cuanto al aspecto macroscópico. Los conejos fueron separados en 3 grupos para biopsia, en el 7^o, 14^o y 21^o días de postoperatorio. No se observó diferencia en el patrón cicatricial en relación a los tratamientos en los diferentes días de observación, cuánto al tamaño y aspecto de la lesión, formación de las fibras colágenas, nuevas formaciones vasculares y reepithelization completa de la epidermis. Tales resultados pueden haber ocurrido en consecuencia del efecto sistêmico de la terapia láser de baja potencia.

PALABRAS CLAVE: Cicatrización de Heridas. Láser. HeNe. Conejos.

¹Médica Veterinária. Doutora. Universidade Paranense, Umuarama - PR. E-mail ana.Paula@unipar.br

²Médica Veterinária Autônoma.

³Médico Veterinário. Mestre. Universidade Paranaense – Umuarama - PR.

⁴Zootecnista. Doutor. Universidade Federal do Mato Grosso. Sinop - MT

⁵Engenheira Agrônoma. Doutora. Universidade Federal do Mato Grosso. Sinop - MT

Introdução

A sigla L.A.S.E.R., tem origem na língua inglesa, abreviando “light amplification by stimulated emission of radiation”; já a palavra laser é consagrada pelo uso e define fonte de luz monocromática, intensa, coerente e colimada, cuja emissão de radiação se faz pelo estímulo de campo externo, com aplicações variadas e crescentes na indústria, na engenharia e na medicina. Esta variedade é uma mistura de gás hélio/neon (HeNe), que produz luz vermelha, que faz com que o raio laser seja absorvido por tecidos, alterando o comportamento celular, sem promover aumento de temperatura. Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação da baixa potência são amplamente discutidos, pois não são conhecidos todos os mecanismos nem todos os elementos que participam da conversão da energia luminosa em energia bioquímica. Atribui-se ao laser de baixa potência efeitos analgésico, antiinflamatório e estimulante da cicatrização (VEÇOSO, 1993), tornando amplo seu emprego terapêutico na medicina, fisioterapia e, mais recentemente, na medicina veterinária.

A terapia com raios laser de baixa potência constitui técnica capaz de acelerar o processo de reparação dos tecidos biológicos traumatizados. Os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular (KARU, 1999). A ação da luz no processo cicatricial ocorre devido ao incremento dos fatores humorais de defesa e aumento da reação leucocitária. Além disso, a luz atua sobre os fibroblastos, estimulando a produção de fibras colágenas elásticas, de forma mais ordenada (CARVALHO et al., 2006). Acredita-se que existam fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Como resultado, há aumento do metabolismo celular, através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias. (MESTER et al., 1985). Pesquisas recentes demonstraram que a aplicação do laser de baixa potência possui a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, além de reduzir o edema local, favorecendo a neovascularização na pele (RENDELL et al., 1997; GUPTA et al., 2003).

Mester et al. (1985) foram os primeiros pesquisadores a estudar o efeito da terapia laser de baixa potência (TLBP) na cicatrização de feridas. Seus trabalhos mostraram efeitos positivos do laser de baixa potência em diversos tecidos. A dosimetria de 1,5 J/cm² foi a recomendada para acelerar a cicatrização cutânea. Ao comparar os lasers de Argônio (514,5 nm) e HeNe (623,8 nm), Kana (1981) observou aceleração significativa na cicatrização entre o 3º e 12º dias de pós-operatório, quando do uso do laser de HeNe, utilizando terapia com 4, 10 e 20 J/cm². Os efeitos benéficos da TLBP sobre o tecido cutâneo, especialmente o laser HeNe, para promover a regeneração epitelial, foram demonstrados por diferentes autores (NISSAN et al., 1986; REDDY et al., 2001; RABELO et al., 2006).

Contrariamente, outros autores relatam falha do laser na aceleração do processo de cicatrização, com o seu emprego no tratamento de feridas (BRAVERMAN et al., 1989;

FRETZ; ZHONG LI, 1992).

Visto que os resultados obtidos em diversos experimentos com metodologia e dosimetria variadas são conflitantes e considerando que a cicatrização de feridas por segunda intenção é processo complexo, e os insucessos relacionados ao tratamento constituem problema clínico importante, o trabalho teve por objetivo estudar morfológicamente a resposta cicatricial de feridas limpas tratadas com laser de baixa potência HeNe em coelhos.

Material e Método

Foram utilizados nove coelhos machos, adultos hígidos, mantidos em alojamentos individuais, que receberam água e ração ad libitum. Os animais foram avaliados clinicamente e anestesiados com associação de maleato de acepromazina⁶, (0,1mg/kg), cloridrato de xilazina⁷ (3mg/kg), maleato de midazolam⁸ (1,0mg/kg) e quetamina⁹ (10mg/kg) por via intramuscular. Atingido o plano anestésico adequado, os coelhos foram posicionados em decúbito esternal, a anti-sepsia foi efetuada pela sequência álcool-iodo-álcool e a área operatória delimitada por panos de campo esterilizados. Foram induzidas 3 feridas limpas, com auxílio de “punch” dermatológico de 10 mm, atingindo a espessura da pele na região paravertebral, mantendo-se distância de 10 cm entre cada defeito.

Decorridas 24 horas do procedimento cirúrgico, iniciou-se a terapia com laser HeNe, com regime de aplicação diária no centro da ferida cirúrgica, de forma pontual, perpendicular à sua superfície, com 1 cm de distância entre a extremidade da caneta e a superfície radiada. Uma das 3 lesões foi tratada com 3 J/cm², outra com 6 J/cm² e a terceira lesão serviu como controle e não foi radiada. Para a radiação foi utilizado laser semiconductor de baixa intensidade, hélio neon, 45W de potência, comprimento de onda de 632,8 nm.

As feridas foram diariamente avaliadas quanto ao seu aspecto macroscópico, presença e característica da secreção. O diâmetro das feridas foi mensurado diariamente, com o auxílio de paquímetro, para obtenção da área de cada lesão. Três animais foram tratados durante 07 dias, outros três receberam radiação por 14 dias e os três coelhos restantes foram tratados por 21 dias. Ao final do período de observação, cada animal foi reoperado, adotando-se os mesmos cuidados pré-operatórios descritos anteriormente, para colheita de um fragmento de pele de cada lesão, com o auxílio de um punch dermatológico de 8 mm. A pele foi suturada com fio de nylon monofilamentar no 4.0, em pontos simples isolados.

Os fragmentos de pele foram processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e tricrômio de Masson, para posterior observação em microscópio óptico de luz, visando observar o processo inflamatório e cicatricial. A partir dos fragmentos corados pelo tricrômio de Masson, realizou-se a contagem do número de fibras colágenas presentes em cada tratamento nos diferentes períodos estudados a partir de 3 campos aleatórios de 100 µm².

A análise estatística foi realizada após transformação dos dados de área (cm²) para a escala logarítmica, com a

⁶ Acepran 1% Univet S.A., Indústria Veterinária São Paulo - SP.

⁷ Anasedan, Vetbrands Saúde Animal. Paulínia – SP.

⁸ Dopalen, Vetbrands Saúde Animal. Paulínia – SP.

⁹ Dormonid, Roche Brasil, Rio de Janeiro - RJ.

finalidade de atender às pressuposições da análise de variância. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com a estrutura em fatorial 3x3, por meio do seguinte modelo estatístico: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$; onde y_{ijk} é a variável resposta na escala transformada, α_i é o efeito do i -ésimo dia pós operatório ($i=1, 2, e 3$); β_j é o efeito da j -ésima dose de radiação ($J=1,2 e 3$); $\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre dias pós operatório e dose de radiação e; ϵ_{ijk} é o erro aleatório relacionado a cada observação de y_{ijk} .

Resultado e Discussão

A técnica operatória utilizada foi de fácil execução e isenta de complicações durante os períodos trans e pós-operatório. Como descrito em literatura (MESTER, 1985), a radiação com o laser HeNe se mostrou simples, e os animais não demonstraram desconforto durante o procedimento.

O coelho tem sido usado para estudar diferentes aspectos envolvidos no processo de cicatrização cutânea e foi a espécie escolhida como modelo experimental pela facilidade de manejo.

A densidade de energia utilizada foi baseada no proposto pela literatura (KANA, 1981; MESTER, 1985). A dose entre 1 e 3 J/cm² é indicada para melhorar a circulação local e ação antiinflamatória. A entre 3 e 6 J/cm² é preconizada com ação regenerativa (VEÇOSO, 1993). Utilizou-se 3 ou 6 J/cm² de forma pontual no tratamento de um defeito de 1 cm de diâmetro, eliminando a possibilidade de empregar doses inferiores às estabelecidas. Os diferentes períodos de tratamentos e doses adotados visaram, a observar o efeito do laser HeNe em fases distintas da cicatrização.

As feridas radiadas por laser e as não radiadas apresentam macroscopicamente aspecto semelhante durante todo o período de observação, à exceção do 14º dia, quando as feridas radiadas com 6 J/cm² apresentaram maior hiperemia, que pode ter sido estimulada pela ação na angiogênese descrita por Schindl et al. (1998).

À partir das medidas das feridas cirurgicamente induzidas, obteve-se a área das mesmas e os resultados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Médias das áreas (cm²) obtidas nos diferentes tratamentos nos grupos estudados:

Dias P.O.	Não radiado	3 J/cm ²	6 J/cm ²
7	0,407	0,374	0,385
14	0,188	0,166	0,173
21	0,085	0,075	0,083

Não houve diferença entre os tratamentos, nos dias estudados, quando considerado o tamanho da ferida.

A avaliação microscópica das lâminas coradas pela técnica da hematoxilina e eosina revelou aspecto semelhante entre os tratamentos nos diferentes períodos estudados. No 7º dia de pós-operatório as lesões possuíam aspecto semelhante nos diferentes animais, com ausência de epiderme e de anexos (foliculo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas), hemorragia superficial multifocal moderada. O tecido de granulação apresentava-se bem desenvolvido, com neovascularização evidente e presença de exsudato focal acima da derme e inflamação subaguda.

Decorridos 14 dias do ato operatório, a análise dos fragmentos de pele revelou presença de epiderme e anexos, tecido de granulação maduro, ausência de hemorragia e edema discreto na derme.

A histologia no 21º dia revelou presença de epiderme com anexos desenvolvidos, tecido de granulação maduro, ausência de hemorragia e exsudato.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos nos diferentes períodos estudados, quando considerado o número de fibras colágenas. As médias de três repetições, correspondentes às fibras colágenas dos animais nos diferentes tratamentos e momentos de observação, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Médias do número de fibras colágenas obtidas nos diferentes tratamentos nos grupos estudados:

Dias P.O.	Não radiado	3 J/cm ²	6 J/cm ²
7	14,22±4,20	15,00±2,64	18,22±8,64
14	13,77±3,19	16,55±3,28	16,77±3,63
21	16,00±4,63	18,11±3,51	13,77±4,86

As pesquisas que avaliam os efeitos do laser de baixa potência têm apresentado resultados controversos. Alguns estudos mostraram aceleração do processo de cicatrização em feridas de ratos com a TLBP (KANA et al. 1981; MESTER, 1985; CARVALHO et al., 2006). Contraditoriamente, Braverman et al. (1989), Fretz e Zhong Li, (1992) e Schlager et al. (2000) não observaram ação estimulante da TLBP nas feridas cutâneas. Apesar de alguns autores relatarem resultados positivos da TLBP no processo cicatricial de lesões cutâneas tratadas por primeira e segunda intenção, especialmente nos primeiros dias (KANA et al., 1981), os resultados aqui obtidos mostram não haver diferença entre as lesões tratadas e não tratadas.

A utilização do modelo tendo o mesmo animal como controle elimina as possíveis variações individuais. Contudo, o efeito sistêmico do laser de baixa potência tem sido relatado (BRAVERMAN et al., 1989; TUNER; HODE, 1998; SCHINDL et al., 2002). O efeito sistêmico ocorre de maneira que o tratamento em uma região tende a afetar outra região distante de maneira similar. Conseqüentemente, deve-se ter precaução ao interpretar os resultados dos estudos nos quais uma parte do corpo do animal foi tratada pelo laser e uma outra parte do mesmo animal foi usada como controle, como no caso em questão. Este modelo parece não ser o mais adequado, apesar de ser adotado por diversos autores. Rochkind et al. (1989), ao radiarem somente a lesão cutânea de animais com lesões bilaterais, observou incremento na cicatrização em ambos os lados, quando comparadas ao grupo controle não radiado.

Para evitar que a radiação em uma lesão pudesse interferir no processo de reparação em outra lesão, tomou-se o cuidado de manter uma distância mínima de 10 cm entre cada uma. Contudo, a TLBP, através do chamado efeito bioquímico, incita a liberação de algumas substâncias pré-formadas, que estimulam o processo de cicatrização. Tais substâncias são carreadas pela corrente circulatória (VEÇOSO, 1993), e podem atingir locais distantes. Esta hipótese poderia explicar os resultados semelhantes obtidos nas lesões tratadas e não tratadas, pelo transporte das substâncias produzidas

localmente para todo o organismo. Estudos comparando os níveis de tais substâncias no local da radiação, com os valores sistêmicos, são necessários para comprovar tal hipótese. Portanto, o modelo com comparação entre grupos tratados e não tratados seria mais adequado para avaliar os efeitos da TLBP.

Outro aspecto importante é o efeito mais pronunciado do laser em tecidos afetados por condição patológica. Turner e Hode (1998) sugerem que o laser estimule diretamente o sistema imune e, portanto, animais saudáveis não respondem tão bem quanto aqueles imunodeprimidos. As condições clínicas de um paciente ou tecido imunologicamente deprimidos não podem ser experimentalmente repetidas, e este fator é significativo na eficácia da TLBP. Isto pode justificar a discrepância algumas vezes observada entre os estudos clínicos e experimentais, bem como os resultados aqui obtidos.

A ausência de parâmetros na literatura para a aplicação do laser de baixa potência dificulta qualquer comparação entre os diversos experimentos. Há grande variabilidade entre o tipo de laser, dosimetria, comprimento de onda, modo de aplicação, tipo de lesão e espécie estudada. É necessário estabelecer protocolos eficazes da aplicação do laser, permitindo a utilização desta terapia com padronização (BASFOR, 1986).

Conclusão

Através da metodologia empregada foi possível concluir que a terapia laser de baixa potência HeNe não incrementou o processo de cicatrização cutânea.

Referências

BASFOR, J. R. Low-energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? **Mayo Clin. Proc.** v. 61, n. 8, p. 671-675, Ago. 1986.

BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.** v. 9, n. 1, p. 50-58, 1989.

CARVALHO, P. T. et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir. Bras.** v. 21, n. 3, p. 177-183, May/June 2006.

FRETZ, P. B.; ZHONG, L. Low energy laser irradiation treatment for second intention wound healing in horses. **Can. Vet. J.** v. 33, n. 10, p. 650-653, Oct. 1992.

GUPTA A. K. et al. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **J. Biomat. Appl.** v. 15, n. 3, p. 177-186, Jan. 2001.

KANA, J. S. et al. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.** v. 116, n. 3, p. 293-296, Mar. 1981.

KANEPS, A. J. et al. Laser therapy in the horse histopathologic response. **Am. J. Vet. Res.** v. 45, n. 3, p. 581-582, Mar.

1984.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near I-R radiation on cells. **J Photochem Photobiol. B.** v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar. 1999.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.** v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

NISSAN, M. et al. HeNe Laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. **Lasers Surg. Med.** v. 6, n. 5, p. 435-438, 1986.

RABELO, S. B. et al. 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, Ago. 2006.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing on diabetic rats. **Wound Rep. Regen.** v. 9, n. 3, p. 248-255, May/June 2001.

RENDELL, M. S. et al. The skin blood flow response in wound healing. **Microvasc. Res.** v. 53, n. 3, p. 222-234, May 1997.

ROCHKIND, S. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg. Med.** v. 9, n. 2, p. 174-182, 1989.

SCHINDL, A. et al. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvasc. Res.** v. 64, n. 2, p. 240-246, Sept. 2002.

SCHINDL, M. et al. Low intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. **Diabetes Care.** v. 21, n. 4, p. 580-584, Apr. 1998.

SCHLAGER, A. et al. Low-Power Laser Light in the Healing of Burns: A Comparison Between Two Different Wavelengths (635nm and 690nm) and a Placebo Group. **Lasers Surg. Med.** v. 27, n. 1, p. 39-42, 2000.

SURINCHAK, J. et al. Effects of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. **Lasers Surg. Med.** v. 2, n. 3, p. 267-274, 1983.

TUNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well known studies. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v. 16, n. 5, p. 245-248, Oct. 1998.

VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia.** São Paulo: Lovise, 1993.

Recebido em: 30/07/2007

Aceito em: 04/06/2008