

Artigo original**Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe*****Collagen fibrea analysis through computerized morphometry in cutaneous wounds of rats submitted to HeNE laser radiation***

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Ms.*, Nilton Mazzer**, João Fabio R. Siqueira***, João Valdivino L. Ferreira ***, Iandara Scherttert Silva****

.....

Professor Titular da disciplina de Fisioterapia Geral - Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP - Campo Grande MS, **Prof. Dr. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, *Acadêmico de Iniciação Científica da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP –MS, ****Profª Dra. Titular da Disciplina de Técnica Cirúrgica do Curso de Medicina Veterinária - Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal- UNIDERP - MS*

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo comparar os resultados dos efeitos da terapia laser na regeneração tecidual de feridas cutâneas. Neste estudo foi realizada uma análise morfométrica do percentual de fibras colágenas por densidade de cor. Utilizamos 48 ratos Wistar, machos, que foram submetidos a uma lesão no dorso e divididos em dois grupos de 24 animais. O grupo I foi tratado com laser e o Grupo II não foi tratado. Os animais do grupo I foram tratados com Laser HeNe com uma dosagem de 4 J/cm² por 36s. Um de cada grupo foi sacrificado no 3º, 7º e 14 dias após a lesão e retiradas as amostras que foram emblocadas em parafina, coradas com H.E., Tricrômico de Masson, realizada a análise morfométrica pelo software Imagelab. Os dados obtidos a partir das amostras retiradas, foram tratados estatisticamente por análise de variância e fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Obtendo para o terceiro dia $p = 0,0223$, para o sétimo, $p = 0,0140$ e para o décimo quarto dia $p = 0,0174$. Podemos concluir que: O laser Helio Neônio se mostra eficiente no tratamento de feridas cutâneas acelerando seu processo de reparo; Quando esta radiação é aplicada há um incremento do processo cicatricial com uma rede de fibras colágenas melhor elaborada do que em animais não submetidos ao mesmo tratamento.

Palavras-chave:

Laserterapia de baixa intensidade, fibras colágenas, reparação tecidual.

Artigo recebido em 13 de maio de 2003; aceito em 15 de julho de 2003.

Endereço para correspondência: Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Departamento de Fisioterapia UNIDERP, Rua Alexandre Herculano, 1400 Parque dos Poderes 79037-280 Campo Grande MS, Tel: (67) 318 3005, E-mail: ptpaulo@terra.com.br

Abstract

The aim of this work was to compare the results of laser therapy effects in the tecdial regeneration of cutaneous wounds. In this study a morphometric analysis of the percentage of collagen fibres for color density was carried through. We used 48 Wistar rats, males, who had been injured in the back and divided in two groups of 24 animals. Group I was treated with laser and Group II was not treated. The animals of group I had been treated with HeNe Laser with a dosage of 4 J/cm² for 36s. One of each group was sacrificed in 3°, 7° and 14 days after the injury and the samples had been poured in paraffin, cut with H.E. and Masson's trichrome, and morphometric analysis was carried through Imagelab software. The data gotten had been estatistically treated by variance analyze and the level of rejection of the nullity hypothesis was fixed in 0,05 or 5% ($\alpha \leq 0,05$). We get for the third day $p = 0,0223$, for seventh, $p = 0,0140$ and for the fourteenth day $p = 0,0174$. We can conclude that: The HeNe laser is efficient in the treatment of cutaneous wounds speeding up the repair process; when this radiation is applied. There is an increment of the cicatricial process with a collagen fibre net better elaborated than in animals not submitted to the same treatment.

.....

Key-words:

Laserterapia of low intensity, collagen fibres, tecdial repairing.

Introdução

A cicatrização é um processo complexo, que tem ao longo dos anos merecido a atenção de pesquisadores principalmente no que tange a fatores que a retardam ou dificultam. As falhas do reparo mais importantes são as que ocorrem nos estágios iniciais, levando a acentuação do edema, reduzida proliferação vascular e diminuição dos elementos celulares tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos.

As alterações desses eventos são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno, além de contribuírem para aumentar os riscos de infecções. Tendo em vista os agravantes mencionados, atualmente, os estudos norteiam-se na busca de novos métodos terapêuticos que possam solucionar, ou ainda, minimizar, as falhas no processo de reparo tecdial. Entre tais métodos a terapia por laser de baixa intensidade tem ocupado lugar de destaque.

Podemos definir de maneira genérica a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminescentes monocromáticos de intensidade relativamente baixa (< 500 mW), para tratamento de afecções e lesões (comumente < 35 J/cm²), como laserterapia de baixa intensidade, ou laserterapia de baixo nível visto que são consideradas baixas, sem possibilidade de provocar aquecimento detectável dos tecidos irradiados [1,2].

O grupo do Prof. Endre Mester foi quem primeiramente se voltou para as possíveis aplicações clínicas das interações atérmicas da luz do laser com os tecidos.

Alguns estudiosos denominam esta modalidade de foto

bioestimulação por laser, terminologia baseada nas pesquisas do grupo de Mester [3], contudo tal terminologia é motivo de controvérsias entre pesquisadores.

Na laserterapia, o comprimento de onda é fator determinante na interação laser-tecido e corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa, sendo medida em nanômetros (nm) e a frequência de suas oscilações em Hertz (Hz). O comprimento de onda pode variar desde o infravermelho distante até os raios cósmicos e segundo seu meio ativo, onde é gerada a radiação. É o meio ativo, em geral, que dá o nome ao laser determinando sua pureza espectral e seu comprimento de onda, conferindo características diferentes de emissão e de possível ação biológica.

A radiação laser pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada pelo tecido. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos, com resposta afirmativa a um ou a vários comprimentos de onda, fenômeno conhecido como ressonância a uma determinada frequência. Cada comprimento de onda, portanto, terá um tipo diferente de interação segundo o tecido alvo.

Os efeitos terapêuticos dos lasers sobre os diferentes tipos de tecidos biológicos são amplos, dentre estes destacam-se os efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, os quais têm sido demonstrados em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Vários autores reportam-se ao tema, entre eles podemos citar os trabalhos que demonstram o aumento na microcirculação local [4,5]; no sistema linfático [6,7];

proliferação de células epiteliais e fibroblastos [8,9] assim como aumento da síntese de colágeno dos fibroblastos [10,11].

A somatória dos fatores que interferem no processo de cicatrização nas feridas cutâneas e, principalmente, sua morbidade, associados aos resultados terapêuticos da radiação laser motivaram o desenvolvimento deste estudo histológico comparativo em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos tratados com laser HeNe.

Materiais e Métodos

Animais de experimentação

A amostra foi composta de 48 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem WISTAR-ADOLFO LUTZ-UFMS, com peso corpóreo variando entre 230 a 350 gramas, adultos procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -UFMS, Campo Grande, MS.

Os animais foram confinados em gaiolas mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por meio de ar condicionado, ração sólida e água *ad libitum*.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos distintos I e II contendo 24 animais em cada grupo, sendo que cada animal recebeu uma designação como: G I tratado laser (GTL); G II não tratados (GNT), cada grupo sofreu ainda uma subdivisão em mais três subgrupos denominados GI A; GIB e GIC, tratados com laser e GIIA; GIIB e GIIC, sendo respectivamente ao terceiro, sétimo e décimo quarto dias pós-cirurgia.

Indução às feridas cutâneas

Utilizou-se neste procedimento o anestésico Quetamina, sendo que para cada 100 g de peso corporal foi utilizado 0,2 ml de anestésico. O tempo de anestesia proporcionado pelo anestésico foi de 55 minutos, sem alteração nos parâmetros fisiológicos e demais funções gerais.

Realizou-se a retirada dos pelos da região dorsal, com lâmina de barbear, seguindo-se então, a antisepsia com povidine-iodine e delimitação do campo operatório com campo esterilizado fenestrado.

O diâmetro confirmado com um paquímetro e o local da incisão marcado com corante de azul de metileno.

Procedeu-se à incisão na pele com iâmetro e largura de 1,5 cm e 0,5 de profundidade com bisturi lâmina 20 e o tecido pinçado e retirado com uma pinça dente de rato.

Após o ato operatório, os animais foram recolocados em gaiolas limpas, sendo quatro em cada uma, com água e ração apropriada, à vontade. Os animais que morreram durante o procedimento foram substituídos, para dar continuidade à pesquisa.

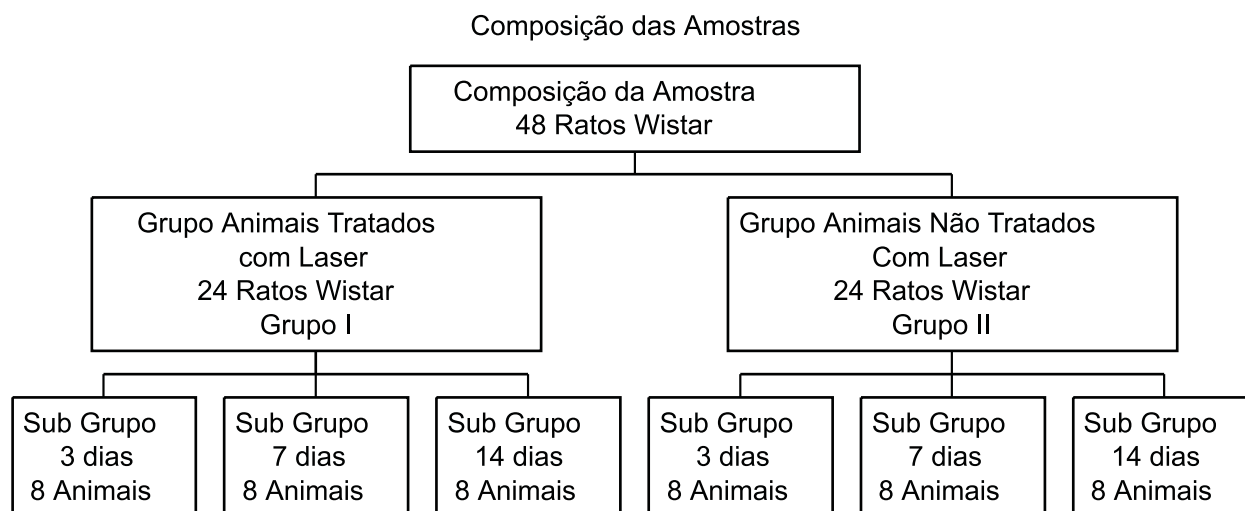
Os animais foram tratados conforme o grupo, durante um período de três, sete e quatorze dias e os dados, anotados em fichas padrão. No dia final do tratamento, foram identificados, pesados e, posteriormente sacrificados por inalação excessiva de éter etílico.

A seguir cada rato foi contido na mesa cirúrgica, efetuando-se a retirada das amostras.

Equipamento laser utilizado

O aparelho utilizado foi o Laser HeNe Plasmax IV, LHN 9709 da marca KLD Biossistemas com potência contínua máxima de 5 mW comprimento de onda de 632,8nm visível.

Fig. 1 - Composição das amostras.



Tratamento

Cada animal do Grupo I foi tratado com Laser HeNe com dosagem de 4j/cm² em uma área de 3 cm², durante 36 segundos em cada lesão. O Grupo II foi adotado como grupo-controle comparativo para a análise histológica e morfométrica.

Técnica histológica

Os segmentos destinados à histologia foram fixados em formol 10% por 24 horas. Após este período, foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5 micrômetros, preparando-se duas lâminas com dois cortes cada uma. Estas lâminas passaram por dois processos de coloração: *hematoxilina-eosina* (HE), *tricrômico de masson*.

As lâminas para estudo de fibras colágenas foram coradas por tricrômico de Masson.

Análise morfométrica

Para análise destas lâminas realizou-se uma avaliação histológica por digitalização de imagens. Utilizamos um micromputador com programa específico de Processamento e Análise de Imagem Imagemlab, do Laboratório de informática aplicado à saúde (LIAS/UNIDERP). Para a quantificação das áreas representativas de colágeno, foram digitalizados quatro campos usando-se a objetiva 20x do microscópio.

Cada campo digitalizado apresentou uma resolução de 640 pontos na horizontal por 480 pontos na vertical e 24 bits de cores (16 milhões de cores). O campo digitalizado correspondeu a uma área de 395 *micra* de largura por 300 de altura na imagem real.

Antes do processo de quantificação, todas as imagens foram digitalizadas padronizando-se a intensidade de luz do microscópio e a altura do condensador. As áreas de colágeno foram separadas na imagem usando-se a distribuição de cor como parâmetro discriminante. Para cada imagem quantificada, utilizou-se o mesmo intervalo de cor para separar a área a ser quantificada. O intervalo de cor padronizado foi definido de forma empírica, no momento inicial do experimento. Através de tentativa e erro, uma faixa de cor foi ajustada, até separar as áreas representativas de colágeno na imagem.

Posteriormente, o mesmo intervalo foi utilizado para identificar o colágeno a ser quantificado em todos os campos digitalizados. Na etapa seguinte, calculou-se a área ocupada e a quantidade de luz absorvida pelo colágeno em cada um dos campos.

Análise estatística

Na análise estatística aplicamos os seguintes testes:

1 - Análise de variância segundo dois critérios (ANOVA),

para estudar a diferença percentual (D%) de fibras colágenas.
2 - Teste de Tukey.

Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Os dados obtidos através da digitalização de imagens para porcentagem de fibras colágenas correspondem à média de quatro campos de imagem digitalizada para cada lâmina obtida a partir das amostras dos grupos I tratado com laser (GTL), grupo II não tratado (GNT), que correspondem respectivamente às amostras retiradas aos 3°, 7° e 14° dias após a lesão.

Tabela I - Percentual total de fibras colágenas

	GTL	GNT
3 dias	24,50	19,69
7 dias	31,77	25,18
14 dias	34,51	29,05

Fig. 2 - Gráfico comparativo, Médias de colágeno

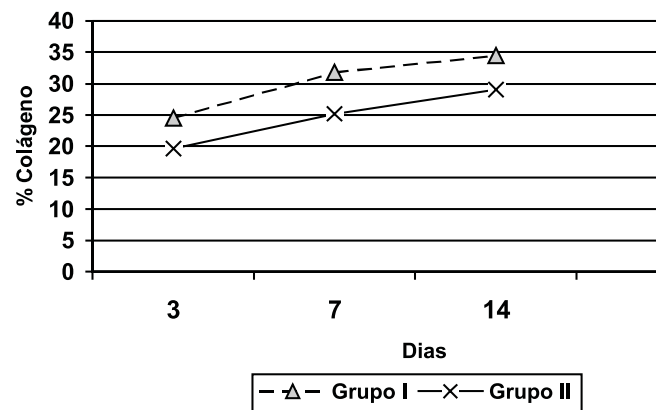
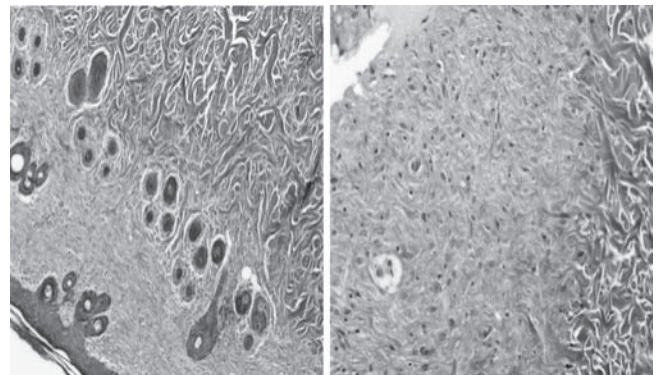


Fig. 3 - Fotomicrografia mostrando a comparação da concentração de fibras colágenas, a foto representada pela letra A e referente ao Grupo I - 14 dias e a representada pela B, grupo II (controle) 14 dias, observar o aumento de fibras e neoformações de vasos no campo A, Lâmina Tricrômico de Masson 200x.



Discussão

Vem de longa data o uso de radiações para acelerar a cicatrização de feridas, entretanto, as radiações da parte vermelha do espectro visível são as que tem mostrado mais eficácia.

Nas décadas de 1960 a 1970, surgiram os primeiros lasers com uso terapêutico. Nesta época os lasers eram usados para destruição tecidual e coagulação, durante este processo foi observado alguns efeitos benéficos nos locais onde havia sido aplicada baixa energia, o que originou o uso bioestimulante dos lasers de baixa intensidade [1].

O grupo do professor Mester entre o fim da década de 60 e início dos anos 70, realizaram estudos relevantes sobre as aplicações clínicas das interações atérmicas da luz do laser com os tecidos. Foram os resultados destes estudos que revelaram o potencial das irradiações dos lasers de baixa intensidade aplicadas diretamente nos tecidos, com efeitos de fotobioestimulação do processo de cicatrização/ reparo dos tecidos [3].

Os estudos *in vivo*, assim como *in vitro*, demonstram que a regeneração tissular torna-se mais eficaz quando tratadas com laser de baixa intensidade. Estes estudos em sua maioria *in vivo* (animais e humanos), corroboram a tese de que o laser de baixa intensidade age sobre a síntese e remodelação de colágeno, número de fibroblastos, diâmetro e força de tração das feridas tratadas, viabilidade dos enxertos, vascularização, vasodilatação, sistema linfático, efeito antibacteriano e imunológico [12].

O efeito mais importante do laser de baixa intensidade sobre a cicatrização de feridas foi o aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos.

Considerando as premissas acima, assim como as outras expostas na revisão da literatura, optamos por trabalhar nesta pesquisa com o laser HeNe, o que possibilitou asseverar tais estudos e amplia-los.

Diversos autores demonstram que o comprimento de onda e a densidade de energia são fatores preponderantes para o sucesso da terapia laser no que tange a cicatrização de feridas [13-17]. As densidades de energia muito altas ou muito baixas não apresentam resultados favoráveis [18-20].

Utilizamos neste trabalho o laser hélio neônio em um comprimento de onda de 632,8 nm e densidade de energia de 4 joules por cm².

A reação inflamatória é um processo dinâmico que tem início em seguida a uma lesão subletal de algum tecido e termina com a cura completa do sítio lesado. Embora às vezes considerado como uma entidade isolada, o processo inflamatório se compõe de diversas partes inter-atuantes, cada uma delas aparentemente não relacionada com as outras [21].

Podemos enumerar estes eventos em três fases: inflamação, proliferação fibroblástica e maturação / remodelação como descrito pelos autores acima os eventos se superpõem e interdepende, uns dos outros.

Após a indução cirúrgica de feridas cutâneas, acompanhou-se o reparo no terceiro, sétimo e décimo quarto dias e verificamos as alterações de colágeno (Tabela I). Esta análise se deu através do uso do software Imagelab, que quantificou a densidade de cor das lamínas histológicas.

Os animais objetos deste estudo apresentaram após 3 dias da indução das feridas, menor índices na porcentagem de colágeno sendo que os do grupo controle, grupo II apresentam valores de colágenos bem abaixo que os do grupo tratados grupo I como pode ser verificado na Tabela I.

A literatura demonstra que nos primeiros dias os eventos de reparo estão direcionados para a prevenção de perda subsequente de sangue, ou seja, a hemostasia e formação de um trombo que fornece matriz preliminar para os processos seguintes, onde as plaquetas aderem ao colágeno no espaço perivascular.

Este contato anteriormente descrito ativa as plaquetas que liberam fatores plaquetários que aceleram a migração e proliferação da principal célula do processo cicatricial, o fibroblasto.

Dando continuidade a este processo, segue-se a vasodilatação o aumento da permeabilidade vascular, e a seguir os monócitos migram para dentro da ferida [22].

A radiação laser quando aplicada até 3 horas após a lesão diminui o exsudato inflamatório, influenciando na permeabilidade vascular [23].

Estudos demonstram que lasers operando em vários comprimentos de onda encorajavam os macrófagos a liberar fatores que estimulavam a proliferação de fibroblastos acima dos níveis controle [24].

O tecido de granulação que começa a ser formado por volta do quarto dia após a lesão, e composto de um leito denso de macrófagos, fibroblastos e neovasos suportados por uma matriz de fibronectina, colágeno tipo I e tipo II, além de ácido hialurônico [25].

Os trabalhos citados acima corroboram os resultados alcançados pelo nosso trabalho, nos três primeiros dias após a lesão o grupo irradiado apresentava nível superior ao seu respectivo grupo controle.

Os resultados obtidos no sétimo dia após a lesão neste estudo apresentaram aumento da porcentagem de fibras colágenas, isto pode ser observado na Tabela I, onde o grupo controle apresenta valores de colágeno menor que o grupo I.

As feridas induzidas nestes animais após o sétimo dia já se encontravam na fase de formação de tecido de granulação e proliferação fibroblástica, onde a matriz extracelular começa e substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (Tabela I).

Em nosso estudo os animais analisados ao 14º dia demonstraram aumento na porcentagem de fibras colágenas em relação ao sétimo dia e também mantiveram os índices relativos entre os grupos.

Quando comparado o 14º com o 7º, ainda podemos observar uma desaceleração do grupo I. Esta desaceleração

no crescimento dos grupos I, talvez deva-se ao estado de maturação destas feridas. Pois a literatura afirma que na fase remodelagem/ maturação a proliferação celular diminui com redução gradual no número e tamanho dos fibroblastos [26]. Concomitante há um lento aumento na resistência elástica da ferida, pois as fibras colágenas sofrem maior interligação aumentando sua espessura e compactação [27].

A presença de oxigênio é de suma importância na etapa de proliferação fibroblástica e maturação. E este pode ser incrementado pela ação do laser no aumento da microcirculação [4,5].

Podemos confirmar nossos resultados com o relato de Ikeuchi [28] que descreve um trabalho onde animais irradiados com laser HeNe com densidade de energia em 3,6 joules/cm² apresentavam ao 14º dia de pós-operatório tecido cicatricial mais maduro, com a maioria das fibras colágenas arranjadas e paralelas em relação aos seus grupos controles.

Conclusão

O trabalho nos possibilitou chegar as seguintes conclusões: O laser Helio-Neônio se mostra eficiente no tratamento de feridas cutâneas acelerando seu processo de reparo.

Referencias

- Oshiro T, Calderhead RG. Low level laser therapy: a practical introduction. Chichester: Wiley; 1988.
- Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. Singapore: Churchill Livingstone; 1994.
- Mester EAF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5:31.
- Miró L. et al. Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv Clin Laser* 1984;1(2):9-14.
- Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci* 1990;5:381-386.
- Lievens PC. The effect of a combined HeNe and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. *Laser News* 1990;3(3):3-9.
- Lievens P. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing: laser. *J Eur Med Laser Ass* 1988;1(2):12.
- Steinlechner CWB, Dyson M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Therapy* 1993;5:65-73.
- Webb C, Dyson M, Lewis WHP. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell culture. *Lasers Surg Med* 1998;22:294-301.
- Enwemeka CS. et al. Morphometries of collagen fibril populations in he-ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg* 1990;(8):151-156.
- Skinner SM. et al. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J* 1996;41:3.
- Rigau J. Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. [Tese] - Facultad de Medicina i Ciència de la Salut, Univ. Rovira i Virgili; 1996.
- Abergel RP, Glassberg E, Uitto J. Increased wound-healing rate in pig skin treated by helium-neon laser. In: *The International Society for Optical Engineering. Proceedings* 1988. p. 6-10.
- Sasaki K, Ohshiro T. Assessment in the rat model of the effects of 830 nm diode laser irradiation in a diachronic wound healing study. *Laser Therapy* 1997;9:25-32.
- Stadler J. et al. The effect of low-level laser irradiation on lymphocytes from peripheral blood. In: *Annual meeting of lasers in surgery and medicine*. 1999. p. 16-18.
- Dyson M, Young S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med Sci* 1982;1(2):125-130.
- Trelles MA, Mester A. Ulceras crónicas en las extremidades inferiores. *Inv Clin Laser I* 1984;2:10-17.
- Terribile WMV, Corti L, Velussi C. A experimental study of the healing effect of the HeNe laser and the infrared laser. *Lasers Med Sci* 1988;3:151-163.
- Bihari J, Mester AR. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neon Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomised double blind comparative study. *Laser Therapy* 1989;1(2):97.
- Al-Watban FAH, Zhang Z. Comparison of the effects of laser therapy on wound healing using different laser wavelengths. *Laser Therapy* 1996;8(2):127-135.
- Ryan GB, Majno G. Acute inflammation: a review. *Am J Pathol* 1977;86:185-276.
- Majno G, Joris I. Cells, tissues and disease: principles of general pathology. EUA: Blackwell Science; 1996.
- Honmura A et al. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med* 1992;12:441-449.
- Young S. et al. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med* 1989;9:497-505.
- Guidugli-Neto J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1987;1:6-8.
- Peacock Jr EE. The wound repair. Philadelphia: WB Saunders, 1984.
- Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:701-725.
- Ikeuchi S et al. Effects of low power HeNe laser on the healing of full-thickness skin defects. *Laser in Dentistry* 1989;2:85-89. ■