

Efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização de queimaduras de 3º grau em ratos

Juliana Medeiros de Moraes¹; Diego Eterno de Oliveira Mendonça¹; Vânia Beatriz L. Moura²;
Milton Adriano Pelli Oliveira²; Cristina Lopes Afonso³; Ruy de Souza Lino Júnior²

1: Instituto de Ciências Biológicas - UFG

2. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG

3. Escola Superior de Educação Física e Fisioterapia do Estado de Goiás - UEG

Endereço eletrônico: julianamedeirosm@hotmail.com

Palavras-chave: Laser, Queimaduras e Ratos

Orientanda: Juliana Medeiros de Moraes; Orientador: Ruy de Souza Lino Junior

INTRODUÇÃO

A pele íntegra é a maior barreira contra infecções de microrganismos que o corpo humano possui. Na queimadura o equilíbrio da microbiota da pele íntegra é modificado, facilitando o estabelecimento e crescimento de bactérias patogênicas. A proliferação dessas bactérias pode ocasionar um quadro de sépsis, que até os dias de hoje é responsável por 75% dos óbitos em pacientes queimados (AZEVEDO; MACHADO; CHASSOT, 2002). Segundo os autores acima, os acidentes por queimaduras ocupam o segundo lugar no mundo. Estima-se que no Brasil ocorram em torno de um milhão de acidentes por ano, envolvendo queimaduras (LIMA JÚNIOR et al, 2009).

Estudos têm buscado novos métodos terapêuticos que possam minimizar ou solucionar as falhas do processo de cicatrização tecidual. Dentre esses novos métodos o laser de baixa intensidade atua como tratamento auxiliar, sendo um recurso utilizado para redução do processo inflamatório e conseqüente reepitelização (BOURGUIGNON-FILHO, 2005).

As lesões que atingem além da derme reticular são tratadas de forma mais cautelosa, pois o risco de infecção é maior, com possibilidade de amputações. Estas lesões necessitam de procedimentos cirúrgicos para promover a cura, como realização de enxerto e retalho pediculado. Para o sucesso destas cirurgias é necessário uma neovascularização no local, que pode ser favorecido com a utilização do laser de baixa intensidade (LBI) (VEÇOSO, 1993).

O uso do laser no tratamento de queimaduras está baseado na sua ação antiinflamatória, com conseqüente analgesia. Isto foi observado em experimentos que utilizaram lasers de diferentes comprimentos de onda, dosagens e modos de aplicação (BAYAT et al, 2008; PEREIRA, 2005; SCHLAGER et al, 2000).

Nesse sentido, é importante realizar estudos experimentais com abordagem histopatológica para fornecer base científica do uso clínico-terapêutico do laser no tratamento de feridas de queimaduras e da importância de seus parâmetros com relação aos efeitos observados. Nos estudos de Lange et al, 2003 e Pereira, 2005 observou-se resultados exclusivamente positivos, porém percebemos ainda uma escassez de trabalhos que visem comprovações sobre a utilização do laser em questão. Desta forma justifica-se a realização de novos estudos que esclareçam os benefícios resultantes dessa modalidade terapêutica quanto à promoção de cicatrização em feridas.

OBJETIVO

Verificar o efeito do laser de baixa potência AlGaInP com diferentes dosagens energéticas na cicatrização de queimaduras de 3º grau em ratos Wistar.

METODOLOGIA

Amostra e Aspectos Éticos

Realizou-se um estudo experimental e prospectivo utilizando-se 36 ratos Wistar, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Goiás (UFG). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG – nº 098/2009.

Os animais foram manipulados de forma cuidadosa e sempre pela manhã pelo mesmo pesquisador e acompanhado por um Médico Veterinário. Realizou-se adaptação dos animais ao ambiente proposto, priorizando o bem estar (JUNQUEIRA, 2007).

Protocolo para Lesão

No dia 0 os animais foram previamente anestesiados, utilizando medicação Ketamina 10% e Xilazina 2%, intraperitoneal, solução 0,01ml/g.

Após isto realizou-se tricotomia da região dorsal do animal para conseqüentemente realização da lesão térmica de 3º grau por meio de água a 95°C em contato com a região escapular do dorso do animal por 14 segundos. O dorso do animal permaneceu em contato com a água fervente através de um molde confeccionado para se padronizar a área a ser lesada, da seguinte forma: O animal foi colocado dentro de um cilindro plástico PVC com uma abertura de 2x2cm com posterior vedação das extremidades do cilindro.

Durante o tratamento todos receberam curativos oclusivos esterilizados com associação tópica de pomada Sulfadiazina de Prata e gel base de papaína 8%. Para oclusão foi utilizado gaze estéril em cima da lesão e manta confeccionada com tecido morin que revestia todo animal. Trocou-se o curativo diariamente, limpando-se a ferida com soro fisiológico.

A analgesia foi realizada durante todo o tratamento com Cloridrato de Tramadol, 30mg/Kg.

Grupos Experimentais

Foram utilizados 36 ratos Wistar pesando de 300 a 350 gramas, com lesões de terceiro grau, divididos em três grupos contendo 12 animais cada, sendo o primeiro o grupo controle, o qual não recebeu tratamento com laser, o segundo recebendo tratamento com dose de 3,0 J/cm² e o terceiro com dose de 6,0 J/cm². Cada um destes grupos foram divididos em subgrupos contendo 3 animais cada para observação aos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a indução da queimadura (DAI).

Aplicação do Laser

Foi utilizado o aparelho - Diodo Laser Contínuo AlGaInP, com as seguintes especificações: comprimento de onda: 660nm, potência do aparelho: 35 mW, potência média de saída: 20 mW, tipo do feixe: colimado, área de emissão: 0,035 cm² e selecionado o modo contínuo. A aplicação do laser ocorreu três vezes por semana, em ambiente de penumbra, no modo pontual perpendicularmente a área queimada, obedecendo ao tempo que o aparelho fornece em cada ponto. Para a aplicação do laser foi construído um suporte para fixação da caneta em um ângulo de 90 graus em relação a lesão, os animais foram previamente contidos em um tubo de material plástico, em decúbito ventral, com os membros em extensão. Baseando-se na metodologia utilizada no trabalho de Borato (2006).

Avaliação Macroscópicas

Nos dias experimentais estabelecidos acima, analisou-se macroscopicamente as fases do processo inflamatório, isto é, inflamação, proliferação e maturação. Foram analisados os seguintes parâmetros: cor da lesão, diferenciando as áreas de hiperemia, estase, necrose, eritema, edema, presença de crostas, neovascularização, hemorragia, reepitelização e tempo de fechamento da lesão. Os animais utilizados no estudo foram eutanasiados por injeção letal de Tiopental Sódico 100mg/Kg de peso.

Avaliação Morfométrica

Para análise da contração da ferida, fotografaram-se as lesões utilizando-se uma câmera digital acoplada em tripé, mantida a uma distância constante de 20 cm da lesão, e em seguida, as imagens foram analisadas pelo software Image J (NIH) versão 1.3.1.

A área da ferida foi contornada utilizando-se o software acima por um pesquisador que desconhecia qual o tratamento utilizado. Logo após os valores foram calculados através da fórmula:

$$GC = \frac{\text{Área } T^0 - \text{Área } T^{\text{dia da eutanásia}}}{\text{Área } T^0} \times 100$$

Onde T^o = dia da indução da lesão, T^{dia da eutanásia} = dias 3, 7, 14 e 21 dias após indução da lesão

Avaliações Microscópicas

O tecido lesionado foi retirado por meio de biópsia, processado para inclusão em parafina, cortados a 4 micrômetros de espessura e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

Os processos patológicos gerais analisados foram:

Crostras	Fibrina, necrose, hemorragia, exsudato, infiltrado PMN e MN
Derme	Fibrina, hemorragia, edema, infiltrado PMN, infiltrado MN, hiperemia, neovascularização, necrose do colágeno, necrose dos anexos, fibroblastos e colágeno
Hipoderme	Infiltrado PMN, colágeno da cicatriz, necrose, infiltrado MN, hemorragia, hiperemia, fibroblasto e neovascularização
Tecido profundo ¹	Infiltrado PMN, necrose, infiltrado MN, neovascularização, fibrina, hiperemia, hemorragia, fibroblastos e colágeno
Bordas das lesões	Reepitelização, colágeno, infiltrado MN, infiltrado PMN, fibroblastos e neovascularização

1-(panículo carnoso e tecido adiposo); PMN (polimorfonucleares); MN (Mononucleares)

A análise foi qualitativa, sendo considerado como ausente (0), discreto 1-25% da lamina (1), moderado de 26 a 50% (2) e acentuado acima de 51% (3).

Através do Picro Sírius realizou-se a identificação e quantificação do colágeno.

Análise Mesoscópica

Por meio da mesoscopia mediu-se o tamanho da ferida aberta utilizando o Programa Image J.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou-se testes paramétricos (ANOVA).

Em casos em que a distribuição não foi normal ou que a variância não foi homogênea, utilizou-se testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A indução da lesão através do tubo PVC em água a 95°C, no tempo de 14 segundos favoreceu uma maior uniformidade da lesão. Através da histologia observou-se necrose/desestruturação de epiderme, derme papilar, derme reticular e hipoderme, comprovando queimadura de 3º grau.

Por meio do método de contenção do animal no tubo plástico e suporte para caneta laser conseguiu-se aplicar a terapêutica no modo pontual com menor dispersão da luz, tendo em vista que a caneta não se movimentava durante a aplicação.

Com a utilização da Papaína a 8% associada à Sulfadiazina de Prata e ao curativo oclusivo não houve formação de crosta durante todo tempo de tratamento, mantendo a umidade da lesão. As lesões não apresentaram características macroscópicas de infecção.

As alterações macroscópicas podem ser observadas nas figuras 1 e 2. Aos 3 DAI não houve diferença na necrose entre os três grupos analisados. No grupo 3 J/cm² apresentou maior hiperemia nas bordas das lesões que o grupo 6 J/cm², e este maior que o grupo controle. Aos 7 DAI o grupo 3 J/cm² apresentou menor necrose que o grupo 6 J/cm², e este por sua vez menor que o grupo controle. No 14º DAI o grupo 3 J/cm² apresentou maior tecido de granulação e fibrose comparado aos demais grupos, estes últimos ainda possuíam necrose no centro e fibrose ao redor da lesão. No 21º DAI o grupo 6 J/cm² teve uma maior reepitelização e fibrose que o grupo 3 J/cm² e este maior que o grupo controle.

Na análise morfométrica para verificação da contração de bordas das lesões de 3 dias teve-se como resultado um aumento característico de edema nas lesões dos grupos controle, 3 J/cm² e 6 J/cm². Nos demais dias as lesões dos grupos que receberam a terapêutica laser houve contração de borda maior que no grupo controle, porem não foi estatisticamente significativo (Figura 3).

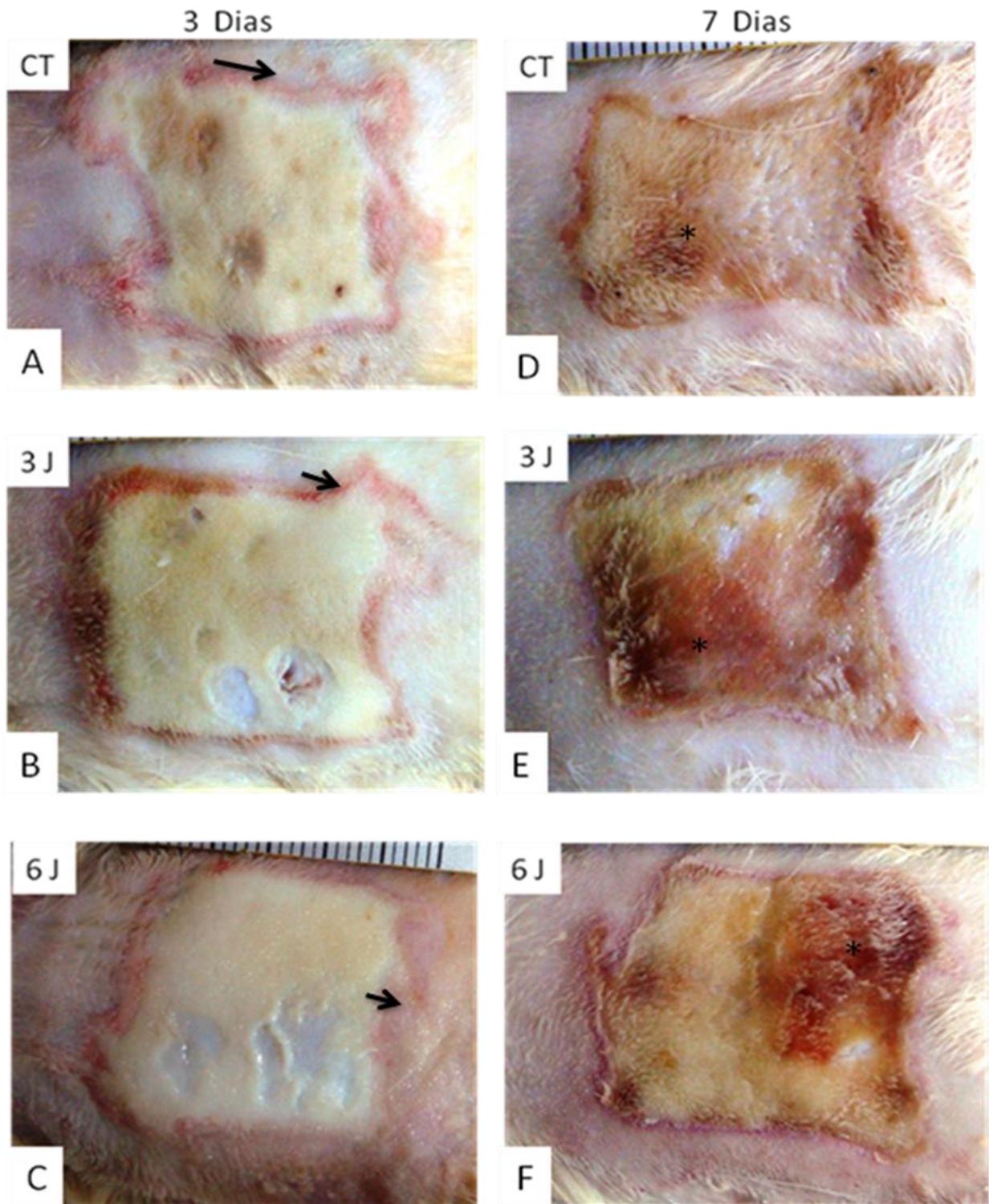


FIGURA 1. Análise macroscópica do aspecto das lesões após 3 e 7 dias de tratamento. (A) (B) (C) Área de hiperemia (seta), ao centro presença de necrose proveniente da queimadura (tecido de coloração esbranquiçada). (D) (E) (F) Presença de necrose proveniente de vasos (*)

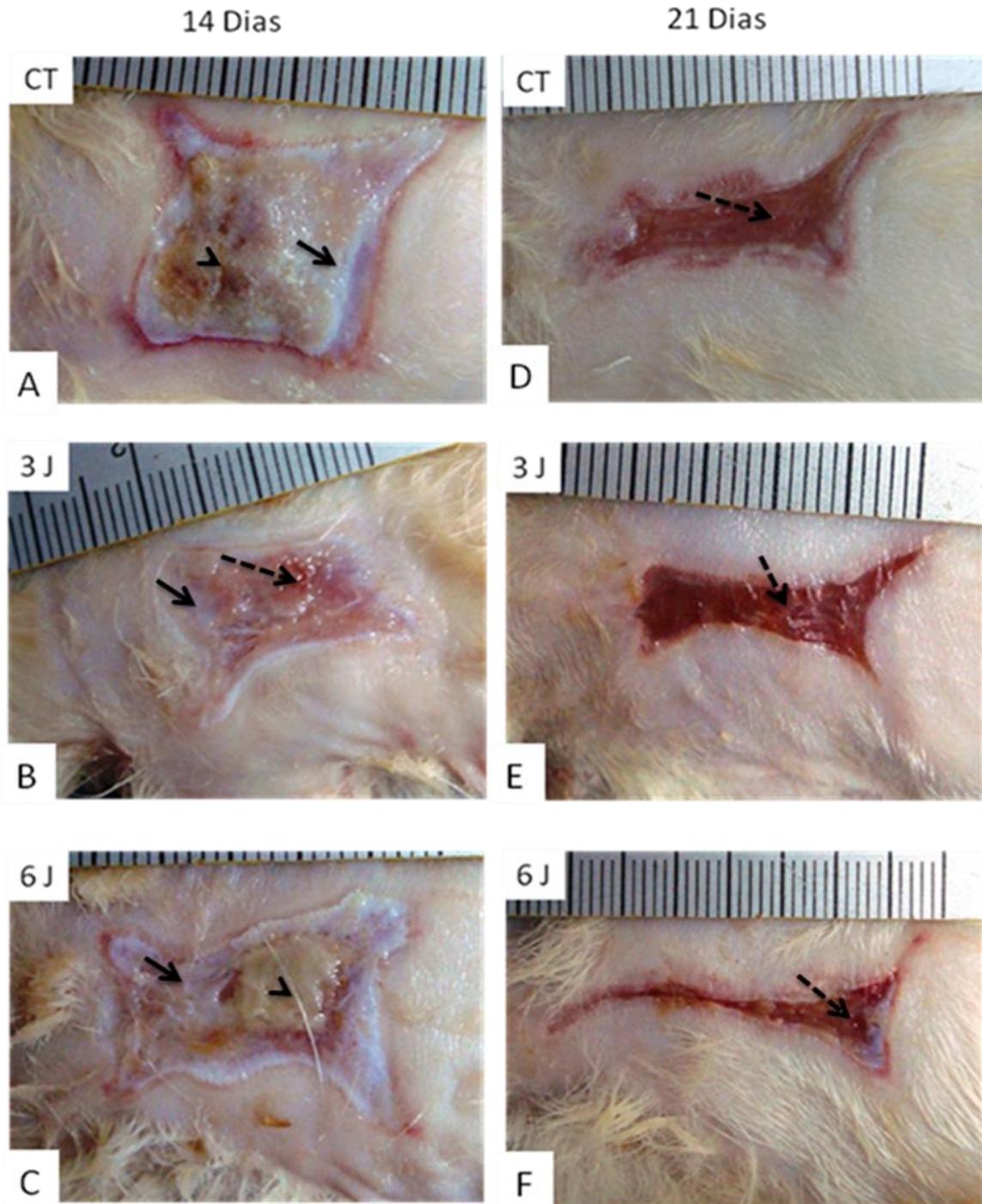


FIGURA 2. Análise macroscópica do aspecto das lesões após 14 e 21 dias de tratamento. (A) Necrose (cabeça de seta) acentuada no centro da lesão e fibrose moderada (seta). (B) Fibrose acentuada (seta) e tecido de granulação (seta segmentada). (C) Fibrose acentuada (seta) e necrose (cabeça de seta). (D) (E) (F) com presença de tecido de granulação (seta segmentada).

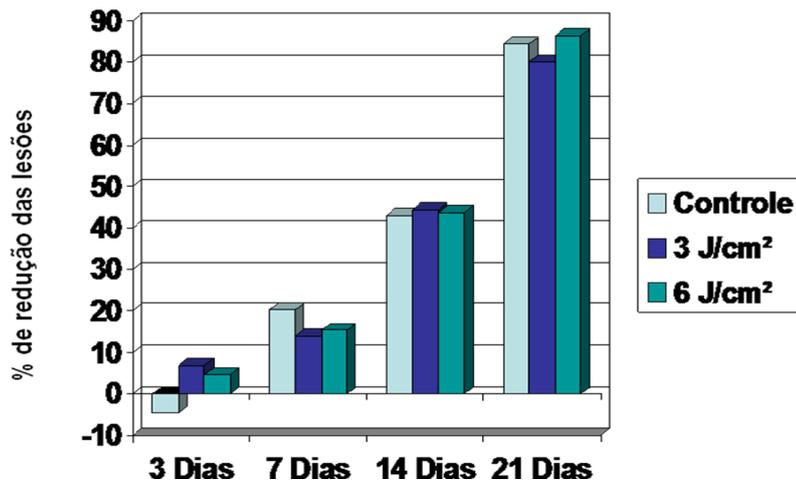


FIGURA 3: Percentual de redução das lesões ao longo dos dias experimentais.

Por meio da mesoscopia observou-se aos 21^o DAI o tamanho das lesões abertas em cada grupo: controle média=132mm; grupo 3 J/cm² média=152mm e grupo 6 J/cm² média=16mm. Pelos dados acima, verificou-se maior reepitelização no grupo 6J/cm² ($p<0,05$) quando comparado aos demais (Figura 6).

Na análise microscópica observou-se ao 7^o DAI que a intensidade de colágeno no tecido profundo foi significativamente ($p<0,05$) maior nos grupos que receberam dose de laser a 3 J/cm² e 6 J/cm² quando comparado ao grupo controle (Figura 4). Foi observado uma maior reepitelização na borda da lesão ao 21^o DAI no grupo de 6 J/cm² quando comparado ao grupo controle, sendo estatisticamente significativo (Figura 5). No mesmo tempo de tratamento a área de reepitelização formada apresentou colágeno tipo I e nas demais áreas colágeno tipo III. Com exceção dos dados acima, todos os outros parâmetros analisados não apresentaram diferenças entre os grupos controle e tratados.

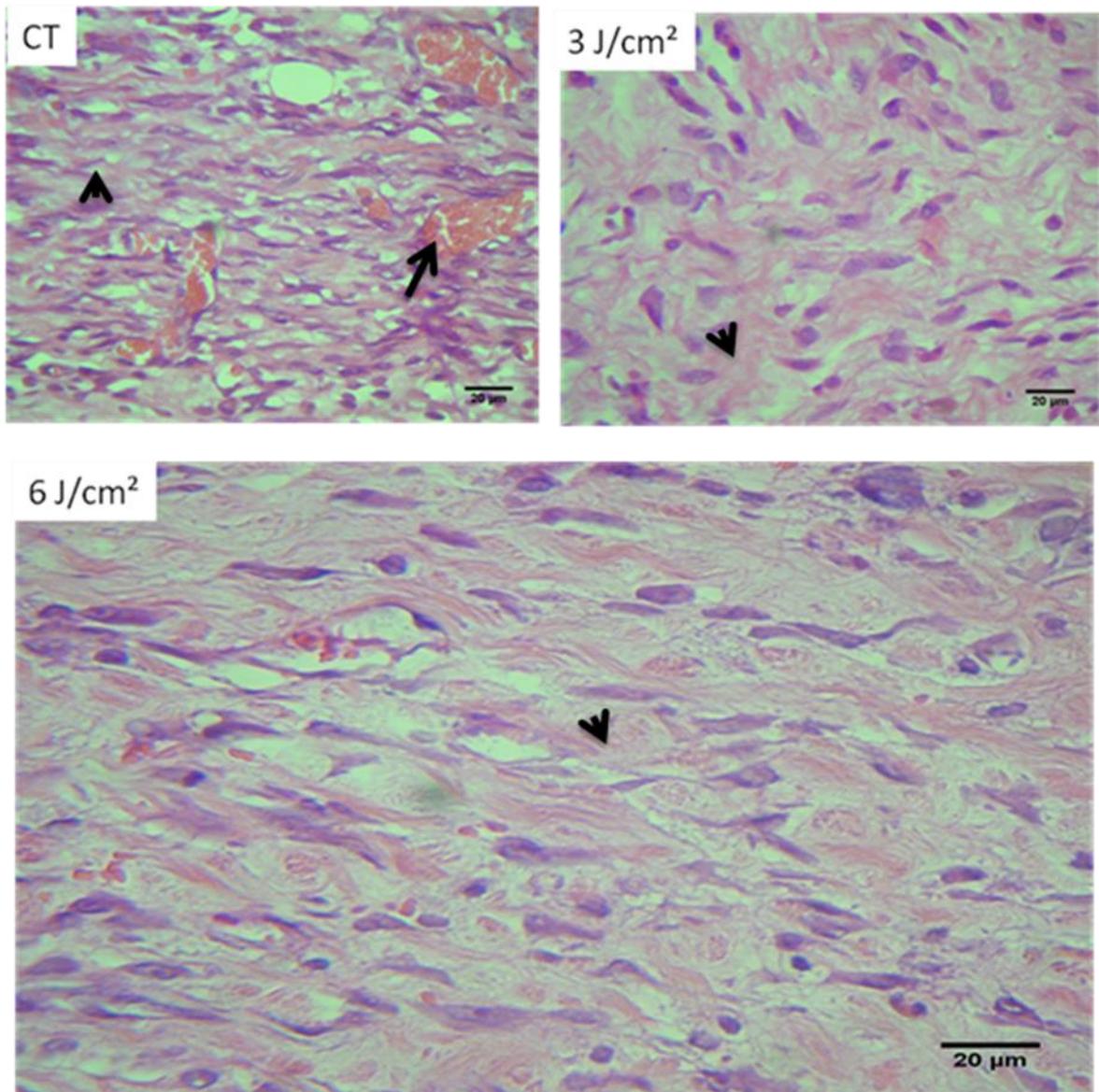


FIGURA 4. Fotomicroscopia da pele de rato com lesão por queimadura de 3º grau, aos 7 dias com produção de colágeno. **Grupo CT (controle):** Tecido profundo, observa-se colágeno mais precoce (cabeça de seta), hiperemia, neovascularização (seta) e acentuado infiltrado inflamatório, (H&E, escala=20µm). **Grupo 3 J/cm²:** Colágeno mais espesso (cabeça de seta), com fibras mais organizadas, (H&E, escala=20µm). **Grupo 6 J/cm²:** Colágeno mais espesso e organizado (cabeça de seta), (H&E, escala=20µm).

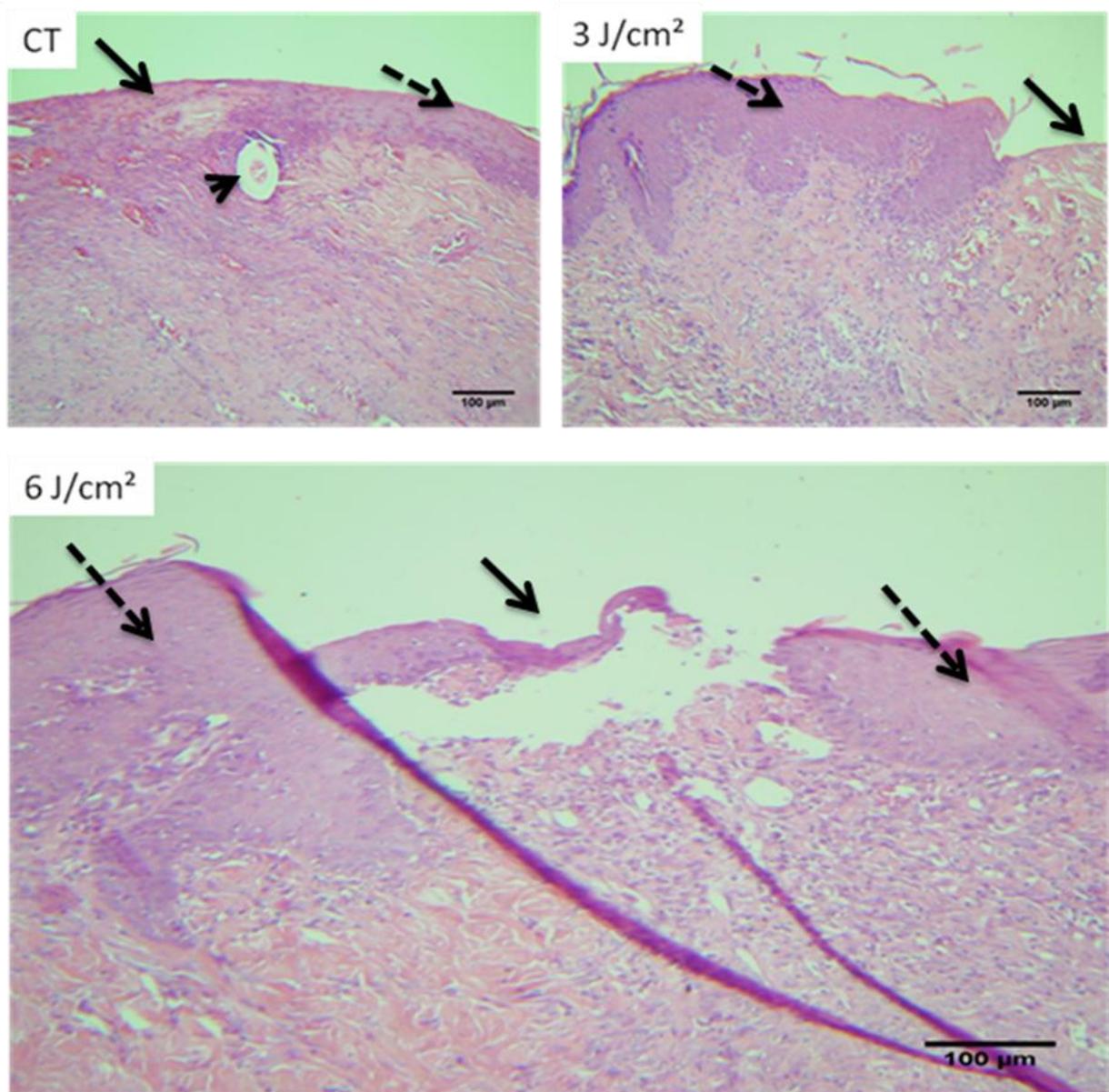


FIGURA 5. Fotomicroscopia da pele de rato com lesão por queimadura de 3° grau, aos 21 dias com reepitelização. **Grupo CT:** Ferida aberta (seta), reepitelização nas bordas (seta pontilhada), hiperemia e pêlo (cabeça de seta) na área de reepitelização (seta pontilhada), (H&E, escala=100µm). **Grupo 3 J/cm²:** Hiperemia, hiperplasia da epiderme (seta pontilhada) e lesão aberta, (H&E, escala=100µm). **Grupo 6 J/cm²:** Reepitelização acentuada (seta pontilhada), colágeno organizado em derme a baixo da área de reepitelização e abaixo da lesão aberta (seta), presença de infiltrado inflamatório, (H&E, escala=100µm).

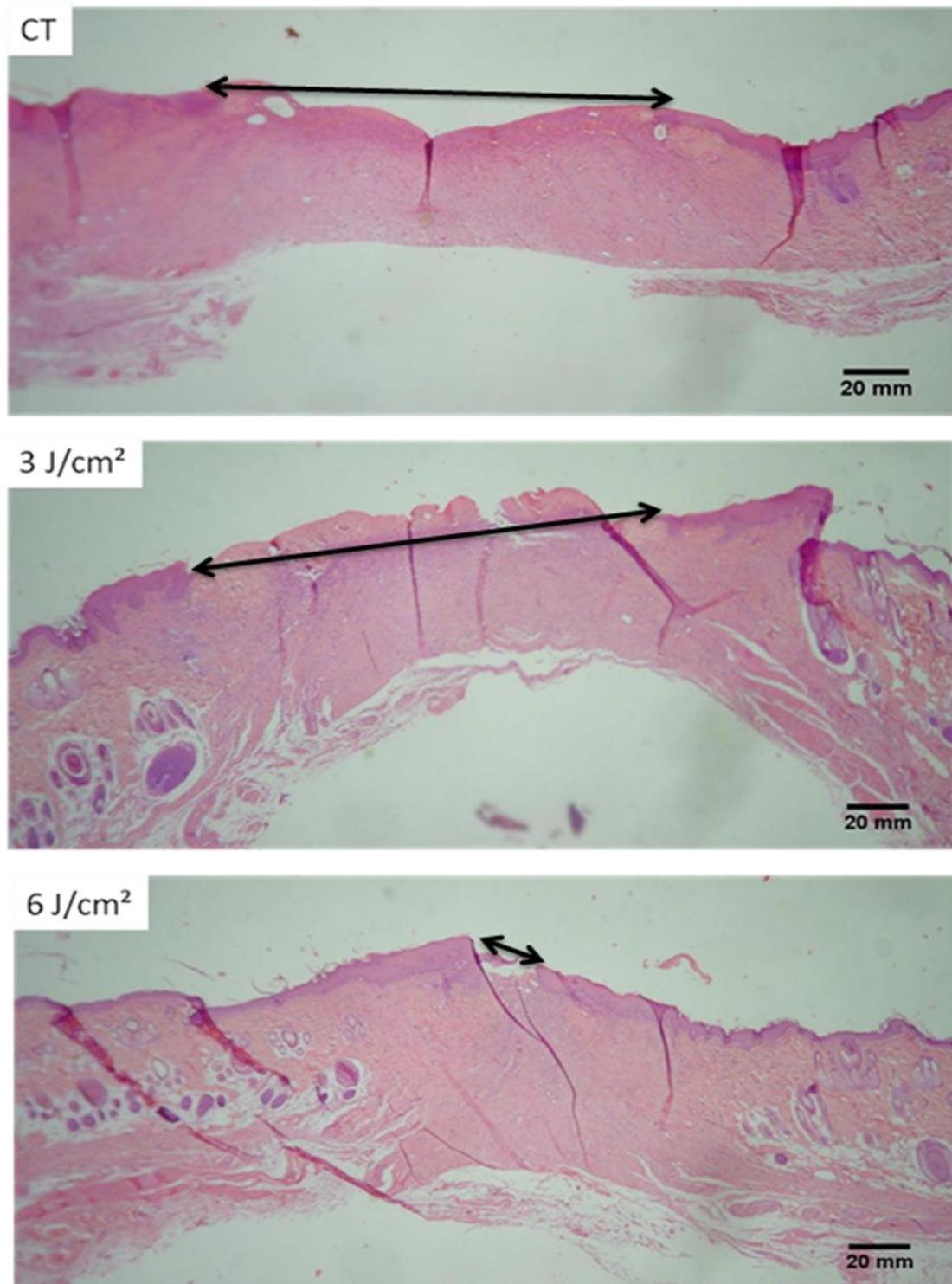


FIGURA 6. Mesoscopia da pele de rato com lesão por queimadura de 3° grau, aos 21 dias. Comprimento das lesões abertas. (CT) 132 mm; (3 J/cm²) 152 mm e (6 J/cm²) 16 mm.

DISCUSSÃO

O laser AlGaInP foi o escolhido, pois engloba os efeitos relacionados com a densidade de energia, e ainda possui uma potência média emitida de 20mW, a qual é muito superior ao do HeNe ou mesmo do AsGa. Isto proporciona um menor tempo de exposição, tendo em vista que Potência e Tempo são grandezas inversamente proporcionais. Outra vantagem é decorrente do fato do material gerador (semicondutores) estar na forma de um diodo, o qual facilita o projeto do aparelho, bem como a sua utilização, em relação ao HeNe, já que não há necessidade de fibra óptica (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

As lesões de 3º grau tratadas com laser AlGaInP, no modo pontual, em uma dose de 6 J/cm², possuiu melhor aspecto macroscópico e maior reepitelização que os demais grupos aos 21 dias, diferente do relatado por Mello *et al*, 2007, que utilizando ratos Wistar tratados com *laser* HeNe no modo varredura a 4 J/cm² e com *laser* pontual na mesma intensidade, encontrou que modo varredura obteve cura total da lesão após 14 dias de tratamento. Porém existe uma grande dificuldade em se comparar os resultados levando-se em consideração que os comprimento de onda dos lasers utilizados são diferentes, além disso, o referido autor realizou aplicações diárias, enquanto que no presente estudo foram feitas 3 aplicações por semana.

No estudo de Mello *et al*, 2007 foi encontrado presença de colônias bacterianas, enquanto que neste estudo não foi observada contaminação. Pode-se afirmar que a utilização do curativo oclusivo com tópicos de Sulfadiazina de Prata e Papaína 8% impediu a colonização bacteriana nas feridas tratadas. O autor citado acima relata ainda que a lesão tratada com LBI apresentou hiperqueratose área focal discreta na epiderme, que consistia em uma crosta de células ortoqueratótica. A presença de crosta não foi observada na presente pesquisa, mostrando a eficácia do desbridamento químico com a Papaína a 8% e os benefícios do curativo oclusivo em lesões por queimaduras.

Ao verificar-se neste estudo com a utilização do laser de 660nm, uma maior quantidade de colágeno aos 7 dias e menor área de necrose nos grupos tratados com laser corroboramos com Chagas-Oliveira *et al*, 2008, que comparou o período de cicatrização entre a terapêutica nos comprimentos de onda 660 nm e 780 nm, encontrando que o grupo que recebeu tratamento com o laser 660 nm apresentou melhor resultado nas fases iniciais do processo inflamatório. Assim como Meirelles, 2005 que também verificou a eficácia do laser de 660 nm de comprimento de onda na fase inicial da lesão.

Não se observou cicatrização completa das lesões aos 14 dias nos diferentes grupos do presente trabalho. Santos *et al*, 2010, utilizando laser de 660nm em lesões de queimaduras de

3º grau em ratos Wistar, também não observou cicatrização aos 14 dias. Acredita-se que esta diferença de demais estudos (BOURGUIGNON-FILHO, 2005) que afirmam uma cicatrização completa aos 14 dias se deve ao fato das feridas cutâneas terem diferentes microambientes, agentes causais diferentes e variações na terapia com LBI.

Até o 14º DAI a lesão possuía necrose proveniente da queimadura e , assim como no trabalho de Santos *et al*, 2010. Motivo este que pode não ter facilitado o processo de aceleração da cicatrização através da terapêutica com o LBI, assim afirma-se que não havia ambiente adequado para a efetividade do LBI sobre o restante das células vivas.

Neste experimento pode-se dizer que a evolução no processo de cicatrização da queimadura de terceiro grau, tanto nos grupos irradiados quanto no controle, se comportou de acordo com as fases da evolução do processo cicatricial. A destruição tecidual causada pela indução da queimadura produziu lesão até hipoderme, que de acordo com a literatura (GOMES, SERRA, PELLON, 1995) resulta em alteração do metabolismo e liberação de substâncias que desencadeiam resposta inflamatória. Houve uma melhora significativa deste quadro no grupo irradiado com laser 6J/cm². Corroborando com os achados evidenciados no estudo de Pereira, 2005, que também utilizou o laser AlGaInP em lesões de terceiro grau.

Aos 21 dias observou-se características macroscópicas da fase proliferativa, onde houve a formação de tecido de granulação evidenciadas principalmente no grupo que recebeu dose de 6 J/cm². Estas características, isto é, presença de fibroblastos, colágeno e capilares são essenciais para regeneração tecidual (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

CONCLUSÃO

A aplicação do laser AlGaInP na dose de 3 J/cm² foi mais eficaz nas fases iniciais da cicatrização enquanto que na dose de 6 J/cm² foi melhor na fase mais tardia da lesão, uma vez que, na dose de 3J/cm² foi observado menor área de necrose e na dose de 6 J/cm² favoreceu a produção de colágeno aos 7 dias e maior reepitelização aos 21 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, A. M. Z.; MACHADO, M. J.; CHASSOT, G. C. Assistência de Enfermagem nos Pacientes Queimados com Curativo Aberto na Unidade de Internação. **Mom. & Perspec. Saúde** - Porto Alegre , v. 15, n. 2, jul/dez. 2002.
2. BAYAT, M.; VASHEGHANI, M.; RAZAVI, N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Iram, v.83, p.87-93, February,2006.
3. BAYAT, M.; VASHEGHANI, M.; RAZAVI, N. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. **Journal of Rehabilitation Research & Development**. Iram, v.45, n.6, p.931-938, 2008.
4. BORATO, E. **Influência da fotoestimulação com laser de baixa intensidade, em ambiente claro e penumbra, na cicatrização de queimaduras de terceiro grau induzidas em ratos Wistar**. Dissertação apresentada na Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, 2006.
5. BOURGUIGNON-FILHO, A.M.; FEITOSA, A.C.R.; BELTRÃO, G.C.; PAGNONCELLI, R.M. **Utilização do Laser de Baixa Intensidade no Processo de Cicatrização Tecidual.Revisão da Literatura**. Rev. Port. Estomatol Cir Maxilofac, 2005.
6. CARLSSON A, UDEN G, HAKANSSON A, KARLSSON ED. **Burn injuries in small children, a population-based study in Sweden**. J Clin Nurs. 2006 Feb; 15(2):129-34.
7. CHAGAS-OLIVEIRA, P.; MEIRELES, G.C.S.M; SANTOS, N.R.; CARVALHO, C.M.C.; SOUZA, A.P.C.; SANTOS, J. N. PINHEIRO, A.L.B., The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. **Photomedicine and Laser Surgery** .v. 26, n.4, p. 289–299, 2008.
8. GOMES, D.R.; SERRA, M. C.; PELLON, M. A. **Queimaduras**. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1995.
9. GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. R. J. **Fisioterapia Dermato Funcional: fundamentos, recursos, patologias**. 3ª ed., Barueri, São Paulo: ed. Manole, 2004.
10. JUNQUEIRA, Ana Paula. **Manejo de Animais de Laboratório: Como Atuar com ética em pesquisa**. Goiânia,2007 Curso de extensão promovido pelo IPTSP/UFG de 26 a 30 de março de 2007.
11. LANGE, F.; KROTH, A.; STEFFANI, J.A.; LORENCETTI, N. Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau. **Fisioterapia Brasil**. v.4, n.5, 2003.
12. LIMA JÚNIOR, E. D.; NOVAES, F.N.; PICCOLO, N.S.; SERRA, M.C.V.F. **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo** 2ª Ed. São Paulo: Ed Atheneu,2009
13. MEIRELLES, G.C.S. **Análise comparativa do efeito dos lasers GaAlAs de 660 nm e 780 nm na cicatrização de úlceras por queimadura em dorso de ratos diabéticos e não-diabéticos: estudo histológico**. Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Bahia e Universidade Federal da Paraíba .2005.
14. MELLO, P.B.; SAMPEDRO, R.M.F.; PICCININI, A.M. Efeitos do laser HeNe e do modo de aplicação no processo de cicatrização de queimaduras em ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, 14(2) 7, 2007.
15. SCHLAGER, A.M.D. Healing of Burns after Treatment with 670-Nanometer Low-Power Laser Light. **J. Dermatol. Surg.**Austria, 105(5), p. 1635-1639, abril de 2000.
16. VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.