



ASPECTOS MACROSCÓPICOS DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS POR QUEIMADURA TRATADAS COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Maisa Ribeiro¹

Pâmela Lunardi Fucks²

Leonardo Presotto Chumpato³

Marcelo Almeida⁴

Julia de Mirada Moraes⁵

Valcinir Aliosio Scalla Vulcani⁶

RESUMO: A cicatrização de lesões cutâneas tem sido uma grande problemática na população, pois é uma causa frequente proveniente de vários fatores como queimaduras e diabetes que podem dificultar esse processo além promover graves alterações morfofuncionais como consequência do processo de regeneração insatisfatório das lesões. A utilização do Laser de baixa potência (LBP) em estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado ser uma alternativa promissora e de baixo custo no aumento da viabilidade, potencial proliferativo, de diferenciação e organização morfofuncional de células-tronco mesenquimais utilizadas na medicina regenerativa. O objetivo deste estudo foi analisar macroscopicamente os efeitos da utilização do laser de baixa potência (LBP) no processo de cicatrização, em modelos de ferida por queimadura de terceiro grau em ratos. Foi induzida lesão de 1 cm² na região dorsal do animal utilizando água a 95°C por 14 segundos para efetuar queimadura de terceiro grau. No dia seguinte ocorreu o desbridamento cirúrgico da área necrosada. A ferida aberta foi tratada com laserterapia nos períodos de três e sete dias. Os resultados demonstraram aspectos macroscópicos característicos de inflamação nos dias iniciais, sem diferenças importantes entre o grupo controle e grupo controle. Os animais que receberam laserterapia por sete dias apresentaram aspectos de cicatrização evidentemente melhores em relação ao grupo controle do mesmo período. Conclui-se que o laser de baixa potência proporciona uma melhora na qualidade da cicatrização, uma vez que estimula a formação de tecido de granulação.

Palavras - chaves: Cicatrização. Inflamação. Microscopia. Queimadura.

¹ Docente do curso de Medicina - Centro Universitário de Mineiros - UNIFIMES e Doutoranda - Curso de Pós-graduação em Ciências Animal, Universidade Federal de Goiás – UFG. maisaribeiro@fimes.edu.br

² Discente do curso de Medicina - Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES. lais_zerlotti@hotmail.com

³ Discente do curso de Medicina - Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES.

⁴ Discente do curso de Medicina - Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES.

⁵ Docente do curso de Medicina – Universidade Federal de Goiás - UFG, Jataí, GO, Brasil. e-mail: mmjulia.edu@gmail.com.

⁶ Docente do curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Goiás - UFG, Jataí, GO, Brasil. e-mail: aloisiosv@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As lesões cutâneas causadas por queimadura de terceiro grau são consideradas a forma mais severa de dano tecidual acarretando na destruição de diversas estruturas epiteliais e tecidos adjacentes, ocasionando um prejuízo local e sistêmico para o organismo (Morais, 2012). O processo de cicatrização resulta de mecanismos fisiológicos que ocorrem em três etapas distintas, inflamatória, proliferação e maturação celular. Cada fase possui características e períodos específicos fundamentais para o desenvolvimento do processo de cicatrização (BROUGHTON, 2016)

O processo inflamatório é a primeira fase do reparo tecidual, inicialmente caracterizada pela liberação de substâncias como IL-1 e TNF- α , que promove a quimiotaxia de células do sistema imune para o local da injúria (Wolf et al. 2014). Os mastócitos localizados na microvascularização da derme são ativados e liberam, entre outras substâncias, a histamina, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, facilitando a infiltração de células polimorfonucleares ao local da lesão, que por sua vez, irão promover a remoção dos debris celulares, proteção contra patógenos e quimiotaxia aos fibroblastos (Lee et al. 2011; Van der Veen et al. 2009).

Segundo Broughton (2016), três dias após a lesão, já se tem início da reepitelização onde as células epiteliais migram da derme profunda para a zona de lesão. Já em casos de lesão da membrana basal, as células das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de reconstruir a barreira protetora. É possível observar também, nessa fase o processo de angiogênese, estimulado a partir dos vasos sanguíneos existentes e pela liberação de citocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células polimorfonucleares (Karimi et al. 2014).

Ao término desta fase ocorre ainda formação do tecido de granulação com deposição de colágeno, evidenciado pela intensa migração de células endoteliais e fibroblastos com aumento da matriz extracelular e deposição de colágeno de forma variável, devido ativação de fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos^{5,6}. Segue a fase de maturação em que ocorre a reorganização da matriz extracelular pela atividade de diferentes colagenases produzidas por fibroblastos e miofibroblastos e a substituição do colágeno imaturo, tipo III, por colágeno tipo I, o que confere maior resistência da pele cicatrizada à aplicação de tensão (Atalay et al. 2014).

As lesões por queimadura de terceiro grau têm sido tratadas convencionalmente por meio do desbridamento cirúrgico seguido de curativo oclusivo contendo agentes umidificantes como a glicerina e microbicidas (sulfatiaziada de prata a 2%) para favorecer o processo de reparo e prevenir infecções (Gentile et al. 2012). Embora este tipo de tratamento tenha se mostrado

eficiente, aumentando a taxa de sobrevivência, há também um aumento do número de indivíduos que passam a apresentar graves disfunções motoras e problemas de ordem psico-emocional e social em consequência às contraturas cicatriciais e deformidades estéticas resultantes (Yoo et al. 2010).

Assim, novos métodos terapêuticos vêm sendo estudados para promover uma recuperação mais morfofuncional e com melhores resultados no tratamento de tecidos danificados por queimaduras de terceiro grau (Lee et al. 2011). No âmbito das novas perspectivas terapêuticas que se desenvolveram nas últimas décadas, o emprego do Laser de baixa potência (LBP) em estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado ser uma alternativa promissora e de baixo custo no aumento da viabilidade, potencial proliferativo, de diferenciação e organização morfofuncional de células-tronco mesenquimais utilizadas na medicina regenerativa (Ebrahimi et al. 2012; Oron et al. 2008). A aplicação do LBP exerce efeitos modulatórios da resposta inflamatória importantes nas fases iniciais do reparo tecidual. Modulação de mediadores químicos, edema, influência sobre a migração de células inflamatórias e incremento de fatores de crescimento foram observados em estudos clínicos e pré-clínicos, colaborando diretamente para o processo de cicatrização (Morais et al. 2012; Piva et al. 2011).

METODOLOGIA

As lesões por queimadura de terceiro grau foram induzidas em 20 ratos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), fêmeas, hípidos com peso entre 300 a 350 gramas mantidos em dois por gaiola e alimentação à base de ração e água *ad libitum*. As trocas das camas foram realizadas duas vezes por semana, utilizando-se maravalha autoclavada, um tipo de serragem feita de fibras naturais. O experimento foi inteiramente casualizado com dois grupos, dois momentos de biópsia (3 e 7 dias após a lesão) e cinco repetições (menor número de animais necessário para obter resultados estatisticamente válidos), que serão organizados da seguinte forma:

GC-3. grupo controle com momento de biópsia de 3 dias após a lesão, composto por 05 animais;

GC-7. grupo controle com momento de biópsia de 7 dias após a lesão, composto por 05 animais;

LBP-3. grupo laser de baixa potência 1 Joule com momento de biópsia de 3 dias após a lesão, composto por 05 animais;

LBP-7. grupo laser de baixa potência 1 Joule com momento de biópsia de 7 dias após a lesão, composto por 05 animais.

Inicialmente, antecedendo os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam medicação pré-anestésica por meio da aplicação de Diazepam (5 mg/Kg) via intraperitoneal (IP), sendo aguardado 10 min para sedação completa, conforme descrito por Kawano, cujo objetivo é acalmar o animal antes do procedimento e torna sua recuperação anestésica mais tranquila. Em seguida, cada animal foi mantido em caixa de indução, recebendo vaporização de aproximadamente 2%V de Isoflurano sendo que após alcançarem indução ideal, a manutenção da anestesia foi realizada por meio de máscara facial com vaporização desde fármaco entre 0,25 a 2%V, de acordo com a resposta do reflexo de reposicionamento e pinçamento da calda. Após perda do reflexo à dor, foi realizada tricotomia de uma área de aproximadamente 6 cm² na região dorsal, seguido de imersão de 1 cm² desta região em água a 95°C por 14 segundos para promover lesão térmica de terceiro grau. Os animais receberam agente analgésico, Tramadol (15 mg/Kg) via intraperitôneal, a cada 8h, por três dias. No dia seguinte após a lesão, os animais foram novamente anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, para remoção do tecido necrosado por meio de um único desbridamento cirúrgico. Ao final deste procedimento a ferida foi protegida de agentes externos utilizando-se curativo oclusivo (Tegaderm™) que permite trocas gasosas.

Os grupos LBP-3 e LBP-7 receberam, imediatamente após o desbridamento, aplicações do LBP, utilizando-se aparelho de laser *Photon Laser III* (comprimento de onda 660 nm, 100 mW de potência, DMC Equipamentos) com deposição de dose de 3 Joule. As aplicações foram feitas em quatro pontos equidistantes e diretamente sobre o leito da ferida, a cada 48 horas após a indução das lesões. Nos mesmos dias foram realizadas as avaliações macroscópicas quanto a: inflamação, necrose, tecido de granulação, grau de formação de epitélio e evolução cicatricial e registradas em máquina digital acoplada a suporte posicionado a 20 cm de distância da lesão. Os dados foram tabulados em planilha Excel *versão 10.1* e as imagens serão analisadas com o software *Image J (NIH) versão 1.3.1.*, para mensuração da área das feridas. Após decorridos o tempo para biópsia de cada grupo (3 e 7 dias após indução da lesão), os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico Halotano (> 5%V) em caixa de indução seguido de deslocamento cervical por se tratar de animais acima de 200g, seguindo especificações da Resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012. Os resultados das mensurações foram expressos em valores numéricos que permitiram posterior análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise macroscópica das lesões realizadas nos grupos controles (GC) e tratados com LBP por 3 dias após o desbridamento cirúrgico da queimadura (LBP-3) apresentaram poucas

diferenças quando comparados. Foi observado que o grupo controle de três dias, apresentaram necrose, hemorragia, edema e exsudato ausentes em 100% (n=5) dos animais. Entretanto, 40% (n=2) apresentaram crosta ausente, 40% (n=2) crosta discreta e 20% (n=1) crosta moderada. Nestes animais, pode se observar ainda que 40% (n=2) apresentaram hiperemia discreta e 60% (n=3) hiperemia moderada. Os demais critérios, fibrose, contração de borda, reepitelização e tecido de granulação apresentaram-se ausentes para esse grupo, o que se justifica por tratar da fase inicial da cicatrização caracterizada pelo processo inflamatório, em que ocorre maiores alterações a nível celular (Tabela 1).

O grupo tratado com laser de baixa potência apresentou no terceiro dia necrose, hemorragia, edema e exsudato ausentes em 100% (n=5) dos casos. Ao analisar a formação de crosta sobre a lesão, observou-se que 40% (n=2) desenvolveram crosta ausente, 40% (n=2) crosta discreta e 20% (n=1) crosta de grau moderada. A hiperemia discreta foi visualizada em 40% (n=2) dos casos, sendo 60% (n=3) identificadas com grau moderado. Os demais critérios analisados como fibrose, contração de borda, reepitelização e tecido de granulação foram ausentes para esse grupo experimental (Tabela 1).

No sétimo dia, tanto o grupo controle, quanto o grupo tratado com o laser de baixa frequência demonstraram alterações relevantes nos aspectos macroscópicos. O grupo controle apresentou 80% (n=4) dos animais com ausência de necrose e 20% (n=1) com necrose discreta. Não foi observada hemorragia, edema, tecido de granulação, contração de borda e reepitelização em nenhum dos grupos. Entretanto, 20% (n=1) da amostra do grupo controle de sete dias apresentaram exsudato discreto, o mesmo não foi observado no grupo tratado com laser por sete dias (Tabela 1).

Em relação a presença de crosta, 20% (n=1) do grupo LBP-7 desenvolveu crosta discreta e 80% (n=4) crosta acentuada. Além disso, observou-se que 100% (n=25) da amostra exibiu, no sétimo dia de aplicação do LBP, exacerbação dos aspectos macroscópicos de hiperemia, fibrose, tecido de granulação, reepitelização e contração de borda. Ausência de hemorragia, edema e exsudato foi determinado em 100% (n=15) dos animais tratados e necrose discreta foi detectada em 20% (n=1) e ausente para 80% (n=4) (Tabela 1).

Os aspectos macroscópicos foram avaliados diariamente e individualmente para cada animal. Não houve variações importantes entre os animais do mesmo grupo, visto que todos foram manipulados de forma padronizada. De forma geral, foi possível verificar uma maior presença de exsudato, hiperemia, necrose, hemorragia e edema nos primeiros dias (20 a 22/09) após a lesão, com prevalência de hiperemia e crosta nos dias subsequentes (23 a 25/09). Esses resultados demonstram o processo inflamatório que ocorreu nos primeiros três dias após a

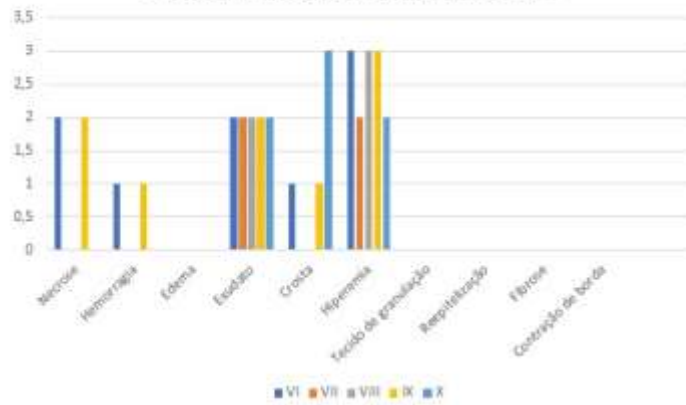
indução da lesão, seguido pela fase de proliferação com surgimento do tecido de granulação caracterizado pela hiperemia do tecido (Gráficos 1 ao 4).

Tabela 1 - Macroscopia de processos patológicos gerais em queimaduras aos 3 e 7 dias após a indução da lesão

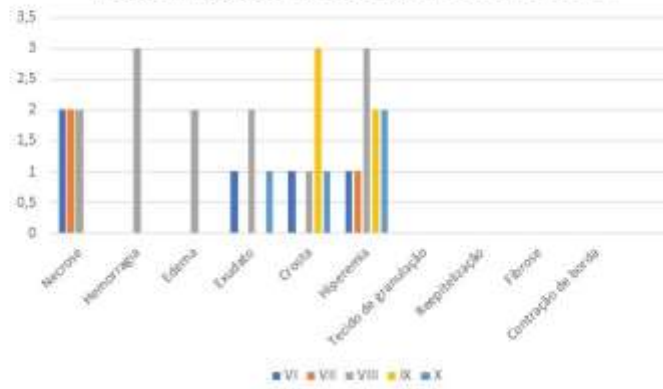
Processos patológicos	GC-3 (n=5)				LBP-3 (n=5)				GC-7 (n=5)				LBP-7 (n=5)			
	% (n)				% (n)				% (n)				% (n)			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Necrose	100 (5)				100 (5)				80 (4)	20 (1)			80 (4)	20 (1)		
Hemorragia	100 (5)				100 (5)				100 (5)				100 (5)			
Edema	100 (5)				100 (5)				100 (5)				100 (5)			
Exsudato	100 (5)				100 (5)				80 (4)	20 (1)			100 (5)			
Crosta	40 (2)	40 (2)	20 (1)			20 (1)	40 (2)	40 (2)					100 (5)	20 (1)		80 (4)
Hiperemia		40 (2)	60 (3)			40 (2)	60 (3)				80 (1)	20(4)				100 (5)
Tecido de granulação	100 (5)				100 (5)				100 (5)							100 (5)
Reepitelização	100 (5)				100 (5)				100 (5)							100 (5)
Fibrose	100 (5)				100 (5)				100 (5)							100 (5)
Contração de borda	100 (5)				100 (5)				100 (5)							100 (5)

0 – Ausente; 1 – Discreto; 2 – Moderado; 3 – Acentuado;

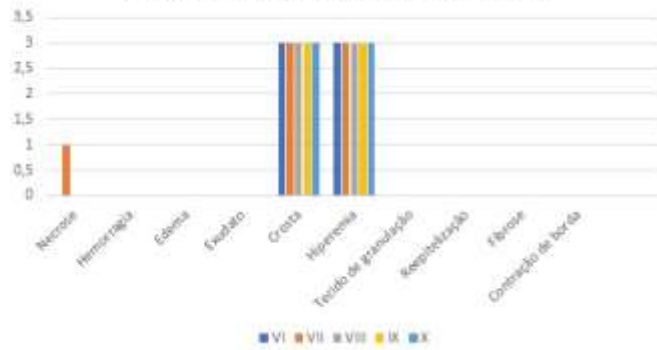
Aspectos macroscópicos das lesões no dia 20.09.17



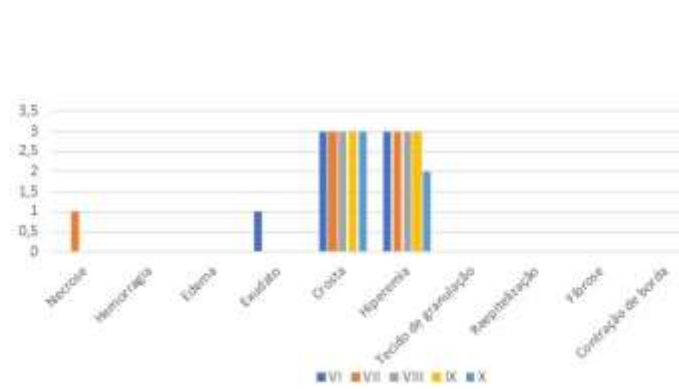
Aspectos macroscópicos das lesões nos dias 21.09.17 e 22.09.17



Aspectos macroscópicos das lesões no dia 23.09.17



Aspectos macroscópicos das lesões nos dias 24.09.17 e 25.09.17



Segundo Morais (2012), o laser de baixa potência (LBP) exacerba os efeitos modulatórios das prostaglandinas, aumenta a ação dos macrófagos, a propagação de fibroblastos, favorecendo a produção de colágeno, colaborando para uma resposta inflamatória permanente, quando analisadas as fases iniciais da reparação tecidual. Dessa forma, os mastócitos e macrófagos excitam a liberação dos fatores de crescimento e de outras substâncias que favorecem a formação e o desenvolvimento do tecido de granulação (Hussein, 2011).

No grupo controle e tratado por três dias foi observado no final do período aspectos macroscópicos relacionados a inflamação, como hemorragia, edema e exsudato. Sendo assim, percebe-se que no período de inicial de três dias não foi possível observar alterações macroscópicas importantes, pois nessa fase do processo de cicatrização as modificações do tecido ocorrem a nível celular. Silveira et al. (2016) ao analisar as mudanças bioquímicas e moleculares do processo de cicatrização epidérmica de queimaduras após o tratamento com LBP e diodo luminoso (LED), puderam verificar que houve maiores diminuições no fechamento da ferida quando utilizado laser e LED com comprimento de onda de 660 nm e 850 nm, respectivamente, em comparação com o grupo controle. Entretanto, neste estudo não foi analisado os aspectos microscópicos.

Após o terceiro dia de indução da lesão, foi observado a presença de hiperemia e crosta principalmente nos animais tratados com laser, sugerindo o desenvolvimento de tecido de granulação nos ratos do grupamento tratados com o laser de baixa potência (LBP), devido ao efeitos modulatórios produzidos por esse tipo de terapia.

A fase proliferativa é caracterizada pela formação de tecido de granulação em que os fibroblastos migram para o local da lesão, sintetizam colágeno e diferenciam-se em miofibroblastos (Darby, 2014). Em estudo com ratos diabéticos submetidos a queimadura de terceiro grau, Meireles et al (2008). observaram um aumento moderado do tecido de granulação na lesão irradiada com laser de 660 nm, sugerindo que a radiação foi capaz de estimular os fibroblastos a migrar para o local da ferida e sintetizar componentes da matriz extracelular. Segundo Darby 2014, durante a fase de proliferação ocorre a migração dos fibroblastos para a área de queimadura e esses sintetizam colágenos que se diferenciaram em miofibroblastos.

Neste estudo foi observado ausência de fibrose e contração da borda nos primeiros quatro dias e somente no quinto dia fibrose e contração da borda acentuada, uma vez que ocorreu a formação de tecido conjuntivo no processo de cicatrização, devido a estimulação da migração do fibroblasto para o local da lesão e aproximação das bordas por meio de miofibroblastos por incitamento do LBP. No quinto dia ocorreu a reepitelização da lesão devido aos efeitos anti-inflamatórios do laser e desse mesmo sobre os fibroblastos.

Além disso, esse tratamento limita a resposta inflamatória minimizando a necrose tecidual (Silveira et. al 2016). Esse fato pode ser observado no gráfico da figura 5, no qual nos períodos dos cinco dias, apenas uma pequena porcentagem de cobaia apresentou discreta necrose tecidual.

Apontaram ausência de hemorragia no período analisado devido a estimulação da neovascularização provocada pelo laser de baixa potência. Isso se deu, pois segundo Enwemeka (1998), o aumento dessa vascularização é essencial para a cicatrização ocorra de forma eficaz

CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo mostrou que a terapia com o laser de baixa potência (LBP), proporciona uma melhora na qualidade da cicatrização, uma vez que estimula a formação de tecido de granulação. Sendo assim, o LBP melhora o processo regenerativo tecidual e inferi na sua utilização futuras em lesões que cursam com grande morte celular, em tecidos com baixo índice regenerativo e em feridas extensas provocados, como as queimaduras.

REFERÊNCIAS

WOLF, S. E, TOMPKINS, R. G. e HERNDON, D. N. **On the horizon: Research priorities in burns for the next decade.** Surg Clin North Am. 2014, 94 (4): 917-30.

VAN DER VEER, W. M., BLOEMEN, M. C. T., ULRICH, M. M. W., MOLEMA, G., VAN ZUIJLEN, P. P., MIDDELKOOP, E., NIESSEN, F. B., **Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation.** Burns. 2009;35(1):15-29.

LEE, S. H., LEE, J. H.; CHO, K. H. **Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice.** Ann Dermatol. 2011;23(2):150-5.

KARIMI, H.; SOUDMAND, A.; OROUJI, Z.; TAGHIABADI, E.; MOUSAVI, S. J.; **Burn wound healing with injection of adipose-derived stem cells: a mouse model study.** Ann Burns Fire Disasters. 2014;27(1):44–9.

ATALAY, S.; CORUH, A.; DENIZ, K. **Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing.** Burns. 2014;40(7):1375-83.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F.; BUNNELL, B. A. **Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells.** Stem Cell Res Ther. 2010;1(2):19.

GENTILE, P.; ORLANDI, A. SCIOLI, M. G.; DI PASQUALI, C.; BOCCHINI, I., CERVELLI, V. **Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery.** Stem Cells Transl Med. 2012;1(3):230-6.

YOO, G.; LIM, S. J. **Effects on adipose derived stromal cells and of their extract in wound healing mouse model.** J Korean Med Sci. 2010;25(5):746-51.

ORON, U.; MALTZ, L.; TUBY, H. **Implatation of low level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infracted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis.** Photomedicine and Laser Surgery.2008; 27(2):227-34.

EBRAHIMI, T.; MOSLEMI, N.; ROKN, A.; HEIDARI, M.; NOKHBATOLFOGHAHAIE, H.; FEKRAZAD, R. **The influence of low intensity laser therapy on bone healing.** J Dent (Tehran). 2012;9(4):238-48.

PIVA, J. A.; et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 2011; 5: 947-54.

MORAIS, J. M.; et al. **Anti-inflamatóry effect of low intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats.** Lasers Medical Science. 2012; 28(4):1169-76.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. **The basic science of wound healing.** Plast. Reconstr. Surg. 2006;117(7):12S-34S.

MEIRELES, G. C.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. (2008) **Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats.** Photomed Laser Surg 26:47–54