

Laser terapêutico e células inflamatórias – parte 2: neutrófilos*

Therapeutic laser and inflammatory cells - part 2: neutrophils

Otacílio Luiz Chagas Júnior^I | Bruna MuhlinbergVetromilla^{II} | Jimmy Charles Melo Barbalho^{III} | Rogério Miranda Pagnoncelli^{IV} | Camila Leal Sonego^V

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a intensidade do infiltrado inflamatório agudo, presente em tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos submetidos à irradiação laser de baixa potência (λ 685 nm) após uma única aplicação. Foram utilizados dezoito ratos machos, linhagem Wistar, de 250 a 300 gramas, nos quais foram realizadas feridas cirúrgicas padronizadas. A amostra foi constituída de seis grupos, três experimentais e três controles, compostos por quatro e dois ratos, cada grupo, respectivamente. Os grupos experimentais foram irradiados em quatro pontos perilesionais equidistantes, com uma única dose de 0,5J/cm² por ponto, com potência de 35 mW, frequência de 35 pulsos por segundo e tempo de aplicação por ponto de 17 s. Os grupos-controles não foram irradiados. Os animais foram mortos 6, 12 e 24 horas após a irradiação, sendo obtidas peças que seguiram para processamento laboratorial de rotina. O estudo das lâminas foi realizado através da descrição e contagem absoluta dos granulócitos pelo método esteriológico. Os resultados obtidos demonstraram que há uma diminuição no número total de granulócitos, não significativa estatisticamente ($p \geq 0,05$), quando comparados aos grupos controles. Concluiu-se que a luz laser é capaz de diminuir a intensidade do infiltrado inflamatório após uma única irradiação.

Palavras-Chaves: laser de baixa potência; granulócitos; hematoxilina e eosina; método esteriológico.

ABSTRACT

The aim of this work was study the intensity of acute inflammatory infiltrate in connective tissue after low level laser therapy ($\lambda = 685$ nm) irradiation. Eighteen male Wistar rats (250 to 300 grams) with standardized surgical wounds were randomly distributed into 6 groups - 3 study groups with 4 rats each, and 3 control groups with 2 rats each. In the study groups, four equidistant spots around the standardized wound were irradiated (0.5 J/cm², 35 mW, 35 Hz, 17 seconds). The control groups were not irradiated. The animals were killed at 6, 12 and 24 hours after laser therapy. Biological specimens were harvested and routinely processed. The total number of granulocytes was counted using the stereological method. A non-statistically significant decrease in the total number granulocytes was observed in the all study groups. Our results showed that one single irradiation with laser light reduced the total number of granulocytes in the animal model used in this study.

Key words: low level laser therapy (LLLT); granulocytes; hematoxiline and eosine; stereological method.

I. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia, Traumatologia e Prótese Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

II. Graduanda Bolsista do Departamento de Cirurgia, Traumatologia e Prótese Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

III. Professor do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte-UERN, Caicó, RN, Brasil.

IV. Professor do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Odontologia da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

V. Cirurgiã-Dentista pela UNIFRA Especialista em CTBMF pela UFPel Mestranda em CTBMF pela ULBRA.

* Trabalho de Tese de Doutorado do Autor Otacílio Luiz Chagas Júnior.

INTRODUÇÃO

O laser de baixa potência tem ação biomoduladora terapêutica importante no processo de reparo tecidual tem sido empregado amplamente, nas diversas áreas da Saúde, sendo a Odontologia uma das que mais faz uso dessa tecnologia.

Os estudos, até então, realizados, pertinentes aos eventos biológicos do reparo, trazem detalhadamente as fases mais tardias, como a inflamação crônica e a deposição de colágeno.¹ Segundo Pereira e Burini², as células inflamatórias aparecem no local da lesão cerca de seis horas após o desencadeamento inicial dessa, com as margens da ferida contendo fagócitos, sendo que, nas próximas 24 horas, com predomínio de polimorfonucleares. A resposta inflamatória aguda está estreitamente interligada ao processo de reparo, servindo para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo, movimentando uma série de eventos responsáveis pela cicatrização e reconstituição do tecido danificado.³

Ao laser de baixa potência vem sendo atribuído efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e estimulantes do processo de cicatrização, sendo o estudo das interações entre a luz laser e a matéria viva marcadamente complexo. A energia depositada nos tecidos sofre fenômenos de absorção, reflexão, difusão e transmissão.¹

Os parâmetros fundamentais do protocolo de irradiação laser essencial para comparação dos dados são os seguintes: comprimento de onda, frequência, potência de saída, diâmetro do spot, tempo de irradiação, intensidade, dose e intervalos de tratamento. O tamanho do spot e o tempo de exposição são de grande importância porque eles determinam a intensidade e a dose e, portanto, as respostas celulares para a incidência da luz. Atermicidade e reações fotoquímicas são a base do laser não-cirúrgico, ocorrendo com densidades de potência entre 10-2 e 100 W/cm² e densidades de energia entre 10-2 e 10² J/cm².⁴

As funções terapêuticas no campo da analgesia e de biomodulação do processo inflamatório são geralmente desenvolvidas no espectro vermelho e infravermelho da luz, de λ 600 nm a λ 900 nm, aproximadamente.⁵ À biomodulação tem sido atribuído o aumento do alcance dos efeitos biológicos desde o crescimento epitelial e fibroblástico, a estimulação da síntese de colágeno, o aumento da capacidade de fagocitose e de liberação de endorfina.⁶

Pretendeu-se realizar este trabalho sobre laserterapia e inflamação aguda, com a justificativa de que não existem trabalhos específicos sobre o tema. O laser de baixa potência é usado em larga escala para os mais diversos procedimentos clínicos na Odontologia, acrescentando que a inflamação aguda é a maior queixa dos pacientes devido aos seus inconvenientes: dor e edema.

O objetivo deste trabalho foi estudar a intensidade do infiltrado inflamatório agudo presente em tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos submetidos à irradiação laser de baixa potência após uma única aplicação.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo descritivo relacional comparativo, aprovado previamente pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o protocolo N° 0094/05.

OBTENÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 18 ratos machos com peso entre 250 e 300 gramas da espécie *Rattus norvegicus*, ordem Rodentia, linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em seis grupos, três experimentais e três controles. Cada grupo experimental foi composto por quatro ratos, e cada controle, por dois (tab. 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais nos grupos. Porto Alegre, RS. 2004

Grupos	Animais
Controle 6h	2
Experimental 6h	4
Controle 12h	2
Experimental 12h	4
Controle 24h	2
Experimental 24h	4

Fonte: dados da pesquisa.

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral (Xilazina® e Quetamina® intraperitoneal). Os animais foram tricotomizados na porção superior de dorso, quando já se encontravam em plano anestésico, sendo lavados com solução fisiológica 0,9% e secos com gaze estéril. Em seguida, foi realizada antisepsia com solução de clorexidina a 2%. A cirurgia seguiu o protocolo de Panarello¹: o *punch* foi posicionado perpendicularmente à superfície da pele da região tricotomizada, promovendo, assim, movimentos giratórios para facilitar penetração da lâmina a uma profundidade de 1mm. Depois, foi dissecado o tecido incluído na demarcação, com bisturi e pinça de Adson Brown, removendo delicadamente a quantidade de tecido necessária à produção de uma lesão com 1 mm de profundidade e 8 mm de diâmetro, que proporcionou uma área tecidual de aproximadamente 0,5 cm² e com volume de 0,05 cm³ (fig. 01). O sangramento não foi interrompido ou removido, permitindo a hemostasia espontânea das feridas.

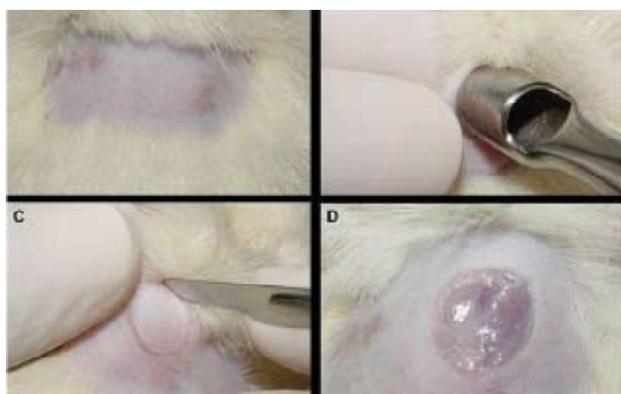


Figura 01. Procedimentos para confecção de ferida cirúrgica – Tricotomia (A); Marcação com o punch (B); Incisão (C) e Ferida cirúrgica (D). Porto Alegre, RS. 2004.

O aparelho laser utilizado foi o modelo Thera-lase® (DMC, São Carlos, SP), de meio ativo InGaIP, emissor laser visível, com $\lambda = 685$ nm, área do feixe de 2 mm², divergência de 1,5°. A aplicação foi realizada imediatamente após a realização da lesão, transcutaneamente nas bordas da ferida, em quatro pontos equidistantes demarcados.⁴ Todos os ratos dos grupos experimentais foram irradiados com o mesmo protocolo de irradiação que correspondeu a uma única aplicação de forma pontual, pulsátil, com frequência de 35 pulsos por segundo, potência de 35 mW e densidade de energia de 0,5 J/cm² por ponto, tempo de 17 segundos, totalizando uma dose total de 2 J/cm² e tempo total de 68 segundos por animal.

A morte dos animais seguiu a distribuição por grupos: 6, 12 e 24 horas após a irradiação laser. Para tal, foi empregada câmara de CO₂, ocasionando morte por parada cardiorrespiratória, respeitando-se a Declaração dos Direitos dos Animais.⁷

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Após a morte de cada animal, foi retirada uma peça elíptica com margem de segurança envolvendo a lesão.

As peças foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado⁸, por um período de 24 horas, em frascos individualizados e separados por grupos. Em seguida, foram seccionadas ao meio e incluídas em parafina. Depois de confeccionados os blocos, foram obtidos cortes histológicos com 5 micra de espessura e montados em lâminas, que foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE).

Para a análise da amostra, foi utilizada a microscopia óptica de luz, objetivando a contagem celular dos granulócitos e descrição do infiltrado inflamatório agudo, através do método esteriológico⁹, utilizando um sistema composto por microscópio Axioskop 40® (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha). Após a eleição das regiões perilesionais,

as imagens nessas regiões foram capturadas com objetiva de 400x através da câmera CoolSnapPro color® (Media Cybernetics® inc, Silver Spring, USA) acoplada ao microscópio óptico e conectada a um computador Pentium IV (Dell® Computer Corporation, Boston, USA) que continha o sistema computadorizado de captura de imagens Image-Pro® Plus, versão 4.5.1.22 (Media Cybernetics® Inc, Silver Spring, USA). As células foram contadas através da ferramenta "Measure", opção Count/Size, modo manual do Image-Pro® Plus.

Tendo como variável independente a irradiação laser de baixa potência e como variável dependente o infiltrado inflamatório agudo, os dados coletados foram tabulados e procedeu-se à análise de variância método paramétrico (One-way ANOVA), com pós-teste de Tukey-Kramer, através do software GrafPad InStat®.¹

RESULTADOS

ANÁLISE DESCRITIVA

Observou-se à microscopia óptica de luz um maior número de granulócitos perilesionais presentes no tecido conjuntivo nos grupos controle em relação aos grupos experimentais 6, 12 e 24 horas. Notou-se também presença de edema conjuntivo nas primeiras 12 horas após a confecção da lesão, principalmente nos grupos irradiados. Houve aumento celular progressivo nos 3 grupos controle e não houve variação nos grupos experimentais entre 12 e 24 h após a irradiação (fig. 02).

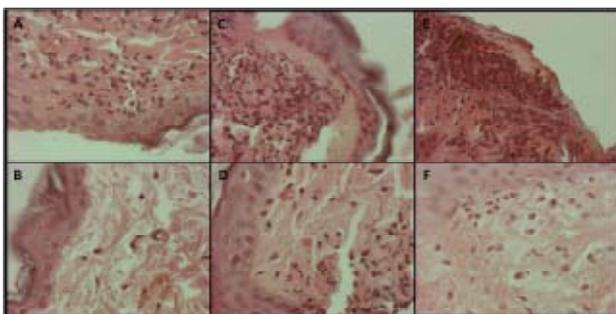


Figura 02. Coloração HE mostrando os granulócitos nos grupos, aumento de 400x. A: Controle 6 h; B: Experimental 6 h; C: Controle 12 h; D: Experimental 12 h; E: Controle 24 h; F: Experimental 24 h. Porto Alegre, RS. 2007.

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de Variância (ANOVA One-way): o valor de P é 0,1371, considerado não significante. A variação entre as médias das colunas não é significativamente maior que o esperado pela ocasião (95%, $P \leq 0,05$).

Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas: Se o valor de q é maior que 4,751, então o valor de P é menor que 0,05 (tab. 2; fig. 03).

Tabela 2. Comparação das diferenças das médias entre os grupos. Porto Alegre, RS. 2007

Comparação	Diferença das medidas	q	Valor de P
Exp. 6h vs Contr. 6h	-31,250	1,302	$P > 0,05$
Exp. 6h vs Exp. 12h	-50,250	2,565	$P > 0,05$
Exp. 6h vs Contr. 12h	-71,250	2,970	$P > 0,05$
Exp. 6h vs Exp. 24h	-45,500	2,323	$P > 0,05$
Exp. 6h vs Contr. 24h	-100,25	4,178	$P > 0,05$
Contr. 6h vs Exp. 12h	-19,000	0,7919	$P > 0,05$
Contr. 6h vs Contr. 12h	-40,000	1,444	$P > 0,05$
Contr. 6h vs Exp. 24h		0,5939	$P > 0,05$
Contr. 6h vs Contr. 24h	-69,000	2,490	$P > 0,05$
Exp. 12h vs Contr. 12h	-21,000	0,8752	$P > 0,05$
	4,750	0,2425	$P > 0,05$
Exp. 12h vs Contr. 24h	-50,000	2,084	$P > 0,05$
Contr. 12h vs Exp. 24h	25,750	1,073	$P > 0,05$
Contr. 12h vs Contr. 24h	-29,000	1,042	$P > 0,05$
Exp. 24h vs Contr. 24h	-54,750	2,282	$P > 0,05$

Fonte: dados da pesquisa

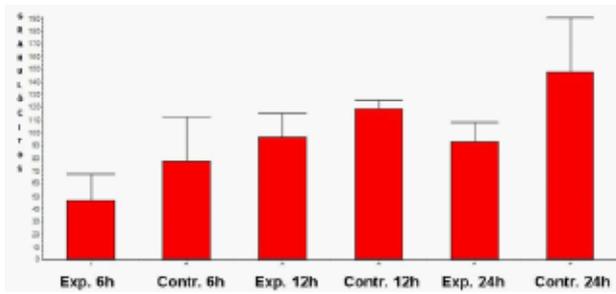


Figura 03. Média e Erro Padrão dos grupos. Porto Alegre, RS, 2007.

DISCUSSÃO

Dentre as intervenções não-farmacológicas para a resolução de processos inflamatórios e algícos, o laser de baixa de potência surgiu como uma alternativa promissora. Dois possíveis mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos vistos nos estudos clínicos com laser de baixa potência. O primeiro possível mecanismo para ação do laser de baixa potência é um efeito modulatório dose-dependente no metabolismo fibroblástico e deposição colágena. O segundo possível mecanismo tem sido pouco estudado, o efeito específico do comprimento de onda, mas ainda se conhece pouco sobre essa questão para se fazerem afirmações.¹⁰

Para o estudo tanto do processo inflamatório quanto o de reparo, muitos tipos de laser de baixa potência (He-Ne; Ga-Al-As) com diferentes comprimentos de onda e regimes terapêuticos têm sido utilizados, bem como o modelo animal estudado e de inflamação induzida, também o período de morte dos animais pós-irradiação, gerando dificuldade em comparar os resultados e na formulação de uma teoria do seu mecanismo de ação.

São muitas as variáveis a serem controladas quando se trabalha com laserterapia: comprimento de onda, frequência, potência de saída, diâmetro do spot, tempo de irradiação, intensidade, dose e intervalos de tratamento. O tamanho do spot e o tempo de exposição são de importância significativa porque eles determinam a intensidade e a dose e, portanto, as respostas celulares para a incidência

da luz. Atermicidade e reações fotoquímicas são a base do laser de baixa potência, ocorrendo com densidades de potência entre 10-2 e 100 W/cm² e densidades de energia entre 10-2 e 10² J/cm².⁴

Concorda-se com Belkin e Schwartz¹¹ ao afirmarem que, embora ocorra o fenômeno associado ao laser de baixa potência, os seus bioefeitos estão longe de serem esclarecidos, apesar de existirem.

Chagas Jr.¹² encontrou uma maior degranulação mastocitária nas primeiras 12 horas após aplicação de laser de baixa potência, o que acarretaria um maior recrutamento das células leucocitárias devido à disponibilidade das substâncias, mediadores químicos da inflamação, tais como a histamina, um potente vasodilatador, fator quimiotático para eosinófilos (ECF) e fator quimiotático para neutrófilos (NCF). Sendo a amostra deste trabalho a mesma utilizada por Chagas Jr.¹², o fenômeno ocorrido com o infiltrado inflamatório não foi o esperado, porém se percebem a presença do edema, correlacionando à degranulação da histamina. Apesar de o resultado não ter sido estatisticamente significativo, pode-se observar a diferença do comportamento do infiltrado inflamatório nos grupos experimental e controle. Esse dado é de alta relevância, uma vez que, para um mesmo protocolo de irradiação, no mesmo modelo animal, ocorreram fenômenos biológicos distintos. Em outras palavras, pode-se inferir que, para cada tipo celular, a irradiação laser tem um efeito, o que dificulta, ainda mais, o estudo dessa terapia.

A fotorrecepção ocorrendo em nível mitocondrial, segundo a teoria de Karu¹³, pode intensificar o metabolismo respiratório e as propriedades eletrofisiológicas da membrana, mudando a fisiologia celular. Pode-se inferir que a luz do laser, agindo nos granulócitos, altera seu processo de diapedese, o que explicaria, em parte, a menor presença do infiltrado inflamatório, mesmo com maior disponibilidade de mediadores químicos, os subprodutos da degranulação mastocitária.

Ferreira et al.¹⁴ não descartam a possibilidade da existência de vasoconstrição após a irradiação laser, corroborando os achados de Pugliese et al.¹⁵ e Lopes-Martins et al.¹⁰ e contrariando a degranulação mastócitária encontrada por Chagas Jr.¹², mas poderia explicar em parte o ocorrido neste estudo com o infiltrado inflamatório. E qual seria a explicação para o edema existente?

Seriam necessários maiores estudos controlados e padronizados em Biologia Celular e Molecular a fim de provar os diversos postulados da ação da irradiação laser em nível celular.

CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos com a aplicação da luz do laser λ 685 nm, nesse protocolo de irradiação utilizado para esse modelo animal, pode-se concluir que

- a) a luz do laser é capaz de diminuir a intensidade do infiltrado inflamatório agudo e o número total de granulócitos, após uma única irradiação;
- b) são necessários estudos mais apurados para a confirmação dos resultados obtidos, como o aumento e pareamento da amostra a ser estudada para obtenção de uma estatística mais fundamentada.

REFERÊNCIAS

1. Panarello, AF. Avaliação da potência e intensidade do laser não ablativo no processo de inflamação e reparo de tecidos moles. Porto Alegre, 2003. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
2. Pereira, PCM; Burini, RC. Resposta do hospedeiro à infecção: 1 - Sistema de defesa e mediadores químicos. Arquivo Brasileiro de Medicina, 1994.
3. Nascimento, PM. Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorsos de ratos: estudo histológico. São José dos Campos, 2001. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Paraíba.
4. Schindl, A. Et Al. Low-Intensity laser therapy: A review. J Investig Med. 2000 Sept ; 48(5):312-26.
5. Tunér, J; Christensen, PH. Low level lasers in dentistry. Disponível em http://www.laser.nu/lllt/laser_therapy_%20in_dentistry.htm. Acesso em 7 de Junho de 2003.
6. Mester, E; Mester, AF; Mester, A. The biomedical effects of laser application. Lasers Surg Med 1985;5(1):31-9.
7. Goldin, JR. Pesquisa em saúde: normas, leis e diretrizes. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1995.
8. Zhong, FC; Zhen, ZJ. Localization and quantification of histamine in injured skin as parameters for the timing of wounds. Forensic Sci Int. 1991 Oct; 51(2):163-71.
9. Gundersen, HJG et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Apmis. 1988 May; 96(5):379-94.
10. Lopes-Martins, RAB et al. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carragenan. Photomed LaserSurg 2005;23(4):377-81.
11. Belkin, M; Schwartz, M. New biological phenomena associated with laser radiation. Health Phys. 1989; 56(5):687-90.
12. Chagas Júnior, OL. Avaliação da ação do laser ($\lambda=685$ nm) sobre os mastócitos: contagem absoluta através do método esteriológico. Porto Alegre, 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

dade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

13. Karu, TI. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989 May; 56(5):691-701.
14. Ferreira, DM et al. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. *Photomed Laser Surg* 2005;23(2):177-81.
15. Pugliese, Ls Et Al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *PesquiOdontol Bras* 2003;17(4):307-13.

ENDEREÇO PARA ORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Otacílio Luiz Chagas Júnior
Departamento de Cirurgia, Traumatologia e
Prótese Buco-Maxilo-Facial
Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de
Odontologia
Rua Gonçalves Chaves, 457 3º andar
Pelotas, RS/ Brasil
CEP 96015-570
Email: otaciliochagasjr@gmail.com

