

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA ASSOCIADA A IDENTIFICAÇÃO DE FIBRAS
CONJUNTIVAS E MACRÓFAGOS NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS
EM CAMUNDONGOS APÓS O USO DA LASERTERAPIA DE BAIXA
POTÊNCIA GaAs**

**HISTOLOGICAL ASSESSMENT ASSOCIATED IDENTIFICAÇÃO OF
CONNECTIVE FIBERS AND TISSUE REPAIR IN MACROPHAGES WOUND
IN MICE AFTER USE OF GAAS LOW LEVEL LASER THERAPY**

MARQUES, Amanda Lemos

Mestre em Ciências Veterinárias UFLA/Lavras

amandamarques@veterinaria.com.br

SEIXAS, Josilene Nascimento

Professora Doutora do Departamento de Patologia Veterinária UFLA/Lavras

CASSALI, Geovanni Dantas

Professor Doutor do Departamento de Patologia UFMG/Belo Horizonte

Juliana OLIVEIRA

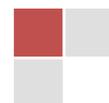
Graduanda do curso de farmácia UFMG/Belo Horizonte

Enio FERREIRA

Professor Doutor do Departamento de Patologia UFMG/Belo Horizonte

Carlos Artur Lopes LEITE

Professor Doutor do Departamento de Medicina Veterinária UFLA/Lavras



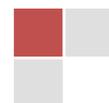
RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar, por meio da análise histológica e imunoistoquímica, o papel da laserterapia de baixa potência GaAs ($\lambda 904\text{nm}$) no processo de cicatrização cutânea em camundongos. Sessenta e quatro camundongos foram submetidos à realização de uma ferida cirúrgica cutânea na região tóraco-dorsal. Em seguida, os animais foram randomicamente divididos em oito grupos de oito animais, onde quatro grupos foram submetidos à laserterapia de baixa potência GaAs ($\lambda 904\text{nm}$) (GL) e quatro mantidos sem o tratamento (GC). De cada grupo, foram sacrificados oito animais nos dias um, três, sete e 14 após realização da lesão e instituição do tratamento. Após a eutanásia, as feridas cutâneas foram coletadas e submetidas ao processamento histológico para análise histomorfométrica, análise de fibras colágenas e fibras elásticas. Foi determinado o índice de macrófagos por campo histológico a partir da técnica de imunoistoquímica com utilização do anticorpo CD68 (KP1; Zymed). Nos GL, a resposta inflamatória após um, sete e 14 dias e a extensão de necrose aos três dias foram menores do que nos animais dos GC. Nos animais do GL, a deposição de fibras elásticas ocorreu aos sete dias, mais precocemente do que nos animais do GC e a organização de fibras colágenas aos 14 dias demonstrou-se mais acentuada. Em relação à presença de macrófagos, observa-se redução significativa dessas células nos GC entre os tempos estudados, entretanto, sem diferença estatística em comparação aos grupos tratados. O laser terapêutico de baixa potência GaAs mostra-se eficiente na antecipação da cicatrização cutânea em camundongos.

Palavras-chave: pele, cicatrização, fototerapia.

SUMMARY

This work aimed at determining the histological characteristics of skin healing and its relation to macrophagocytic infiltrate in mice submitted to low power GaAs laser therapy ($\lambda 904\text{ nm}$). Seventy four *Swiss* mice were submitted to a surgical skin wound in the thoracoldorsal region and divided into two distinct groups: Laser Group, submitted to low power GaAs laser therapy ($\lambda 904\text{ nm}$) and Control Group, maintained without treatment during all the experimental period. Eight animals of each group were sacrificed at distinct times: day 1, 3, 7 and 14 after the injury was done and the



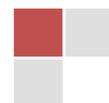
treatment was established. The skin wounds were collected and submitted to histological processing for histomorphometric analysis, collagen fibers and elastic fibers. The macrophage per histological field was determined by means of the immunohistochemistry technique using the antibody CD68 (KP1; Zymed). A smaller inflammatory response was observed after 1, 7 and 14 days in animals submitted to laser therapy. However, the deposit of elastic fibers was found more precociously and the organization of collagen fibers at 14 days presented itself more accentuated. A difference regarding the presence of macrophages in the studied groups was not observed. Therefore, it may be said that low power GaAs therapeutic laser is shown to be efficient in the inflammatory process and anticipation of skin healing process in mice, however, without apparent relation to macrophagocytic infiltration.

Key words: skin, healing, phototherapy.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos demonstram a influência da laserterapia de baixa potência no sistema imunológico (KIPSHIDZE et al, 2001; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; NOVOSELOVA et al, 2006), no reparo tecidual (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 2001; MEDRADO et al, 2003; RIBEIRO et al, 2004; PINHEIRO et al, 2006; REIS et al; 2008) e na diminuição da dor e da inflamação (MEDRADO et al, 2003; BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; REIS et al, 2008; MARCHIONNI et al, 2010).

Estudos prévios com macrófagos demonstraram que a irradiação pelo laser He-Ne tem a capacidade de promover estímulo a atividade macrofágica e aumentar a atividade fagocítica (BERKI; NÉMETH; HEGEDÛS, 1988; ZHENG et al, 1992; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003). Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra infecções e desempenham um importante papel na indução, regulação e expressão da resposta imune (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003). Essas células do sistema imunológico orquestram o processo de reparo cutâneo em diferentes fases (DELAVERY et al, 2011).



A importância do papel do macrófago no processo de cicatrização foi estudada em diversos trabalhos, nos quais se observou que camundongos que sofreram ablação de macrófagos apresentaram um atraso na cicatrização devido ao prejuízo da fibroplasia, à redução da proliferação de fibroblastos e da neovascularização (LEIBOVICH; ROSS, 1975; MIRZA; DIPIETRO; KOH, 2009).

O presente estudo tem por objetivo verificar, por meio da análise histológica e imunoistoquímica, o papel da laserterapia de baixa potência GaAs ($\lambda 904\text{nm}$) no processo de reparo tecidual em camundongos e sua relação com a formação de fibras conjuntivas e a infiltração de macrófagos, promovendo a reorganização tecidual.

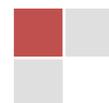
MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos Animais

O presente estudo foi aprovado de acordo com protocolo nº 048/11 do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Sessenta e quatro camundongos (*Mus musculus*), *Swiss*, pesando aproximadamente 30g, com 10 semanas de idade foram submetidos aos procedimentos experimentais no Biotério da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais em sala com temperatura controlada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, ciclo dia: noite 12 horas e receberam ração Nuvilab® e água *ad libitum*.

Após a adaptação de cinco dias, os animais foram randomicamente distribuídos em oito grupos de oito animais, onde quatro grupos foram submetidos à laserterapia de baixa potência e quatro mantidos sem o tratamento, a saber: Grupo-Laser 1 dia (GL1), avaliação da lesão 1 dia após, com uma aplicação de laser; Grupo-Controle 1 dia (GC1); Grupo-Laser 3 dias (GL3), avaliação da lesão 3 dias após, com três aplicações de laser; Grupo-Controle 3 dias (GC3); Grupo-Laser 7 dias (GL7), avaliação da lesão 7 dias após, com sete aplicações de laser; Grupo-Controle 7 dias (GC7); Grupo-Laser 14 dias (GL14), avaliação da lesão 14 dias após, com quatorze aplicações de laser; Grupo-Controle 14 dias (GC14).



Ferida cirúrgica

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina na dose de 0,1ml para cada 100g de camundongo da mistura de 1ml de cetamina (50mg) e 1ml de xilazina a 2% (20mg), aplicadas por via intramuscular na face externa da coxa.

Após indução anestésica, realizou-se tricotomia e assepsia com álcool 70°GL na região dorsal dos animais, em uma área de aproximadamente 3cm².

Na sequência, provocou-se uma ferida nesta região com o uso de um *punch* de 4mm de diâmetro. Os animais receberam analgesia com dipirona aplicada por via intramuscular na face externa da coxa, em dose única de 50mg/Kg.

Laserterapia de Baixa Potência

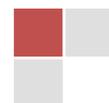
Durante a terapêutica, os animais foram imobilizados com auxílio de um dispositivo confeccionado em tubo Falcon®, constante de um tubo sem saída de 4,5cm de diâmetro e dotados de uma perfuração anterior para aeração e de uma janela superior, onde permaneceu exposta a região da lesão (PEREIRA, 2001), na qual a probe do laser foi posicionada de forma perpendicular e apoiada diretamente sobre a ferida, protegida por papel filme (transparente) para evitar a contaminação da mesma.

Nos animais dos GL, as lesões foram irradiadas com laser terapêutico de baixa potência pulsado, com comprimento de onda de 904nm, GaAs, potência de pico 25W, duração de pulso 200ns (modelo Physiolux Dual®, Bioset), densidade de energia de 1J/cm² por 23 segundos. O equipamento foi calibrado e revisado pelo fabricante antes do período experimental.

A irradiação foi realizada em única aplicação diária, em horário e condições de umidade semelhantes. Nos animais dos GC, foi considerado tratamento placebo a utilização do equipamento, com a probe posicionada da mesma maneira e pelo mesmo tempo, porém desligada.

Histopatologia

Posteriormente à eutanásia, fragmentos de pele da área da ferida cirúrgica foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%, processados pelos métodos de rotina de inclusão em parafina para realização de cortes histológicos de 3µm.



A partir disto, as etapas de preparação, colorações e análises das lâminas foram realizados no Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

Os cortes foram submetidos à análise de microscopia óptica de luz convencional, após as colorações hematoxilina-eosina (H.E.) para avaliação histomorfométrica e Verhoeff para análise das fibras elásticas (PROPHET et al, 1992), e em microscopia óptica em luz polarizada, após coloração por *picro-sirius red* para caracterização do tipo de colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Para a avaliação microscópica, foram obtidas imagens digitais de campos histológicos em aumento de 40x, a partir do software Spot Basic associado ao sistema de captura digital conectado ao microscópio Olympus BX40, sendo analisados cinco campos histológicos para avaliação histomorfométrica, três campos para avaliação de fibras colágenas e três campos para avaliação de fibras elásticas.

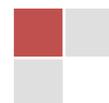
A avaliação histomorfométrica foi realizada em todos os grupos e determinada a partir do percentual de áreas de inflamação, necrose, edema e tecido normal com o auxílio de uma grátula com 100 pontos obtidas no software Corel Draw 11, semelhante a usada por Silva et al (2004). Para análise das fibras colágenas no GC14 e GL14, a mesma grátula foi utilizada para determinar as porcentagens de fibras vermelhas, que representam colágeno imaturo e fibras verdes, que representam colágeno maduro (FERREIRA et al, 2003).

Adicionalmente, para a avaliação das fibras elásticas no GC7, GL7, GC14 e GL14, quantificou-se o número de fibras por campo a partir do software Corel Draw 11.

Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

O índice de macrófagos tecidual foi avaliado por imunoistoquímica utilizando marcador de macrófagos Anti-CD68 – Clone KP1 (Zymed). Foi realizada a técnica de reação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (ADVANCE HRP – ready to use – DakoCytomation).



A recuperação antigênica foi realizada usando solução de pepsina a 0,04% incubada a 37°C durante 30 minutos. Para realização de bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico. Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação em câmara úmida do anticorpo primário na concentração 1:50 de 1 hora e os demais reagentes de 30 minutos, com exceção do cromógeno DAB (DAB substrate system, Dakocytomation), de cinco minutos. Como controles positivos foram usadas amostras de glândula mamária de cadela previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

Foram considerados macrófagos as células com positividade citoplasmática evidente para o anticorpo CD68.

Para a avaliação microscópica de todos os grupos, foram obtidas imagens digitais dos campos histológicos a partir do software Spot Basic associado ao sistema de captura digital conectado ao microscópio Olympus BX40, sendo analisados cinco campos histológicos em aumento de 40x para quantificação de macrófagos/campo.

Análise Estatística

Inicialmente, para cada parâmetro avaliado foi calculada a média dos valores \pm desvios padrão (DP). Os GC e GL foram comparados usando o teste T não-pareado analisados pelo software Graphpad Instat 3.0 for Windows.

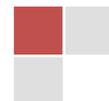
Nos casos de comparações múltiplas entre os grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey.

Todos os valores foram apresentados com desvio padrão e considerados significantes quando assumiram valores para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os animais mantiveram-se saudáveis e apresentaram características de cicatrização sem evidências clínicas e/ou macroscópicas de infecção.

Histomorformetria



Nos grupos de animais com 1 dia de lesão, observou-se a destruição tecidual com infiltrado inflamatório polimorfonuclear intenso e mononuclear moderado (Figura 1A; Figura 1B). A inflamação foi mais acentuada no GC, sendo que a diferença entre as médias do GC 1 e o GL1 (Tabela 1) foi considerada significativa estatisticamente (Tabela 2). A fibrina, quando presente, estava concentrada na superfície da lesão com coloração fortemente eosinofílica.

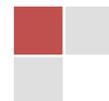
O estroma do tecido conjuntivo apresentava pequenas fibrilas esparsas e desorganizadas, entremeadas por edema severo distribuído por toda área da lesão (Figura 1A). Células necróticas com núcleos pinócticos estavam dispersas na área de inflamação. As médias de áreas de edema e necrose eram semelhantes no GC1 e no GL1 (Tabela 1).

Aos 3 dias após lesão, observou-se ainda sinais de inflamação aguda na derme, com infiltração intensa de polimorfonucleares e moderada de mononucleares, com células íntegras e degeneradas (Figura 1C; Figura 1D). A inflamação apresentava-se discretamente maior no GL3, porém sem diferença significativa do mesmo em relação ao GC3 (Tabela 2).

Observou-se epitélio em regeneração com migração de ceratinócitos, rara angiogênese e hiperemia em ambos os grupos. Algumas lesões ainda possuíam fibrina depositada na superfície. O GL apresentava quantidade moderada de fibroblastos e escassa de matriz extracelular, enquanto que o GC demonstrava escassas quantidades destes componentes (Figura 1C; Figura 1D). Neste período, não foram observadas diferenças.

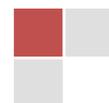
Sete dias após a lesão, o infiltrado inflamatório, constituído principalmente de mononucleares, apresentava-se em intensa quantidade em ambos os grupos controle e laser (Figura 1E; Figura 1F), sendo maior no primeiro, com diferença estatisticamente significativa (Tabela 2) entre as médias (Tabela 1).

Notou-se presença de tecido de granulação e o processo de reepitelização estava completo em ambos os grupos, sendo que no grupo laser, o epitélio apresentava-se mais espesso na maioria das lesões. Havia grande quantidade de fibroblastos, fibrócitos subjacentes a epiderme e neovascularização, especialmente no GL. (Figura 1E; Figura 1F).



Aos 14 dias após a lesão, em ambos os grupos controle e tratado com laser não se observava mais necrose e edema. A inflamação apresentava-se em grau discreto, sendo menor no grupo laser com diferença entre as médias (Gráfico 1) estatisticamente significativa (Tabela 2). A reepitelização estava completa em ambos os grupos e nos animais do GL havia deposição de estrato córneo. GC e GL demonstraram neoangiogênese, repilação, fibroblastos e fibrócitos (Figura 1G; Figura 1H).

Na comparação evolutiva da inflamação nos grupos controles (GC1, GC3, GC7 e GC14) houve diferença estatística extremamente significativa (Tabela 2), diferente do observado no grupo tratado (Gráfico 1).



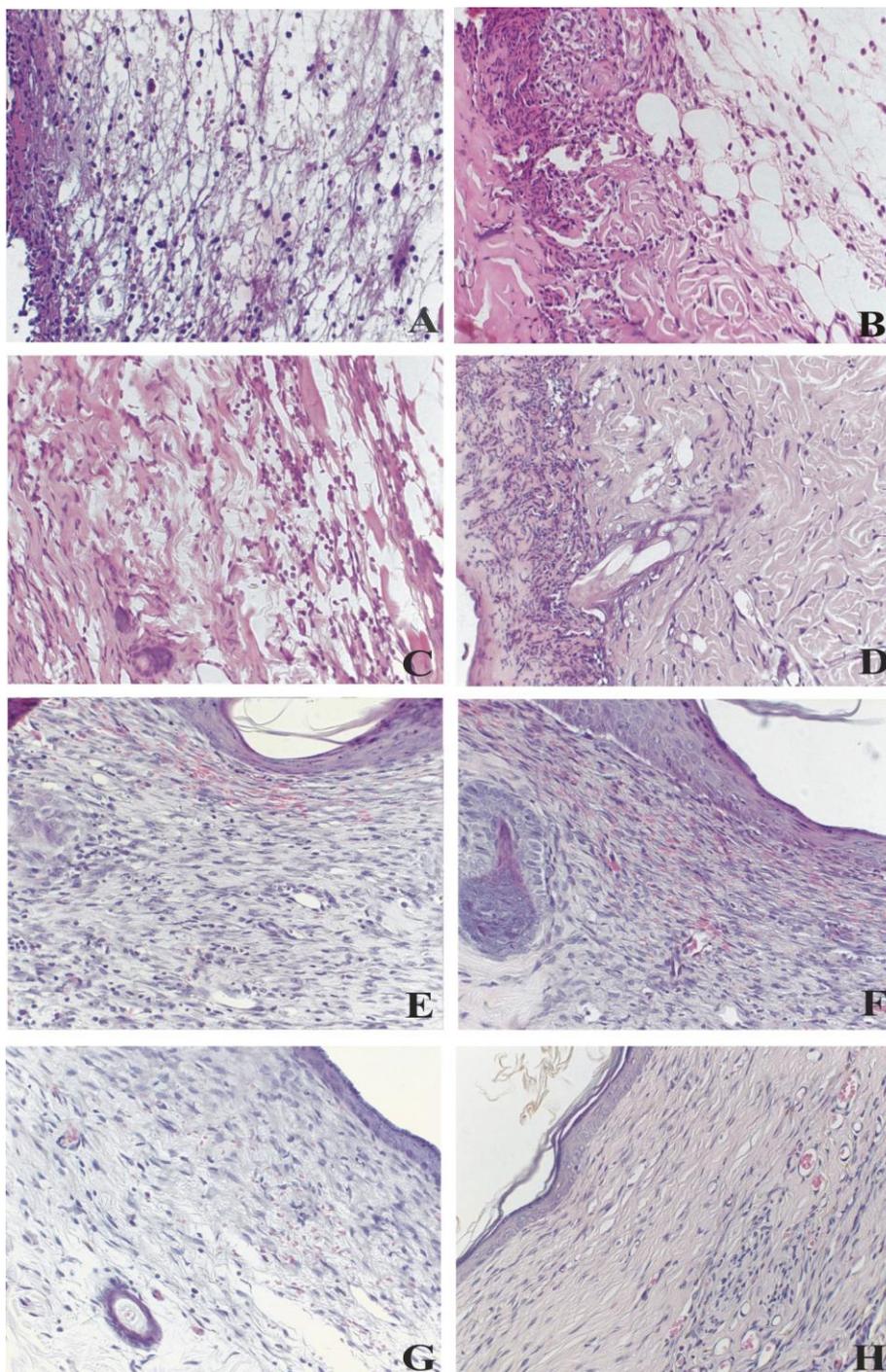
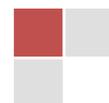


Figura 1 Processo inflamatório e cicatricial na pele de camundongos após laserterapia em 1, 3, 7 e 14 dias de tratamento (coloração H.E. em aumento de 40x). A) Lesão de um animal do GC1. Nota-se presença de intenso infiltrado inflamatório por toda área da lesão, áreas de edema e necrose. B) Lesão de um animal do GL1. Presença de intenso infiltrado inflamatório por toda área da lesão, áreas de edema e necrose mais discretas



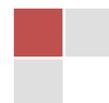
do que no GC. C) Lesão de um animal do GC3. Desorganização do colágeno, presença de intenso infiltrado inflamatório na derme, áreas de edema e necrose. D) Lesão de um animal do GL3. Maior organização do colágeno, presença de intenso infiltrado inflamatório na crosta e na derme, mínimas áreas de edema e necrose. E) Lesão de um animal do GC7. Presença de tecido de granulação e reepitelização completa. Nota-se ainda presença de infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos. Raras áreas de edema e ausência de necrose. F) Lesão de um animal do GL7. Presença de tecido de granulação e reepitelização completa com epiderme espessa. Nota-se ainda presença de infiltrado inflamatório na derme, angiogênese mais evidente, fibroblastos, fibrócitos e folículo piloso. G) Lesão de um animal do GC14. Reepitelização completa, presença de pouco infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos e folículo piloso. H) Lesão de um animal do GL14. Presença de reepitelização completa com deposição de estrato córneo, infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos.

Análise de fibras elásticas e fibras colágenas

Nos animais tratados com laser, observou-se maior deposição de fibras elásticas aos 7 dias após lesão quando comparados aos animais controle (Figura 2), sendo essa diferença entre as médias (Gráfico 3) estatisticamente significativa (Tabela 3).

Em relação aos grupos de 14 dias após a lesão, notou-se maior deposição de fibras elásticas no GL14 (Figura 2), entretanto na comparação entre as médias (Tabela 1) não existiu diferença significativa (Tabela 3).

A comparação evolutiva da formação de fibras elásticas entre os grupos controles (GC7 e GC14) demonstrou diferença estatística significativa (Tabela 3), diferente da comparação para os grupos tratados com laser (GL7 e GL14), nos quais não existiu diferença significativa (Tabela 3).



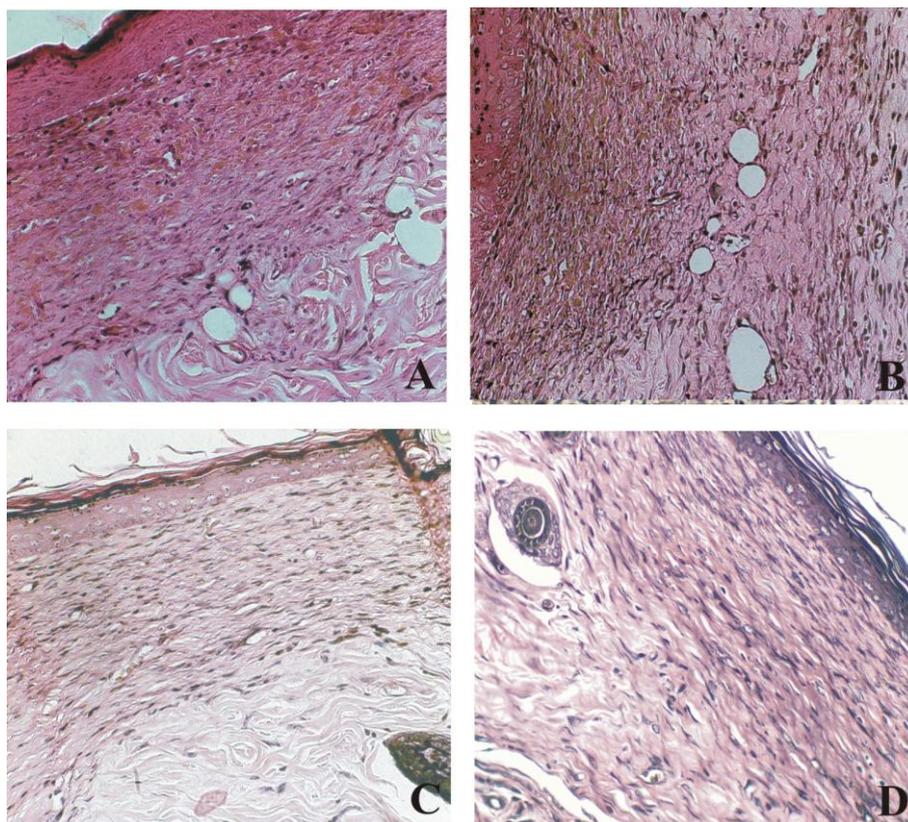
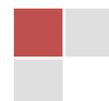


Figura 2 Identificação de fibras elásticas na pele de camundongos após laserterapia em 7 e 14 dias de tratamento (coloração de Verhoeff em aumento de 40x). A) Lesão de um animal do GC7. Nota-se menor expressão de fibras elásticas. B) Lesão de um animal do GL7. Há maior expressão de fibras elásticas a sua presença no tecido de granulação. C) Lesão de um animal do GC14. Nota-se reepitelização com pouca expressão de fibras elásticas e presença destas na área da cicatriz. D) Lesão de um animal do GL14. Nota-se uma maior expressão de fibras elásticas.

Para análise de fibras colágenas, em ambos os grupos, essas fibras tendiam a organização, porém nos animais do GL14, essa organização do colágeno era mais evidente (Figura 3).

Na avaliação de fibras colágenas, os animais controle demonstraram uma quantidade discretamente menor de fibras vermelhas tal qual maior de fibras verdes (Tabela 1), sem qualquer diferença estatística (Tabela 4).



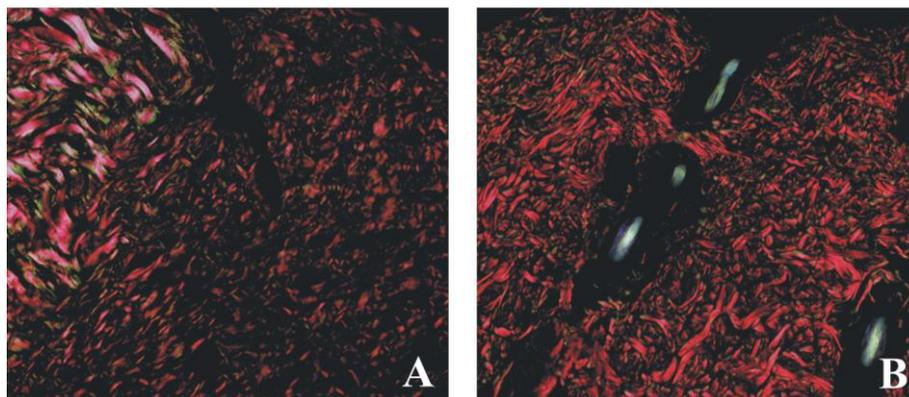


Figura 3 Identificação de fibras colágenas na pele de camundongos após laserterapia em 14 dias de tratamento (coloração *picro-sirius red* em aumento de 40x). A) Lesão de um animal do GC14. Nota-se uma menor expressão de fibras colágenas imaturas e mínima quantidade de fibras maduras no lado esquerdo da figura, no qual observa-se tecido normal. B) Lesão de um animal do GL14. Há maior expressão de fibras colágenas imaturas com tendência a organização e ausência de fibras maduras (Coloração *picro-sirius red*; aumento de 40x).

Análise imunoistoquímica

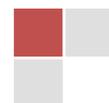
Na avaliação imunoistoquímica, observou-se um menor índice médio de macrófagos no GL1 quando comparado ao GC1 (Tabela 1), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 5).

A média de macrófagos foi muito semelhante nas lesões dos animais do GC3 e GL3 (Tabela 1), não havendo diferença estatisticamente significativa (Tabela 5).

Em relação aos grupos de 7 dias após a lesão, a média de macrófagos foi discretamente maior no GC7 do que no GL7 (Tabela 1), todavia sem diferença significativa (Tabela 5).

Aos 14 dias após a lesão, na avaliação imunoistoquímica, a média de macrófagos foi maior no grupo de animais não submetidos ao tratamento (GC14) (Tabela 1), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

Realizando a comparação evolutiva da deposição de macrófagos entre os grupos controles (GC1, GC3, GC7 e GC14) não houve diferença estatística significativa (Tabela 5), porém notou-se um número maior de macrófagos no primeiro dia após a lesão e sua redução gradual. Comparando evolutivamente os grupos tratados com laser (GL1, GL3,



GL7 e GL14), observou-se que os macrófagos aparecem no primeiro dia no leito da lesão, aumentam no terceiro dia e reduzem apenas no sétimo e décimo quarto dias, sendo essa redução não significativa estatisticamente (Tabela 5).

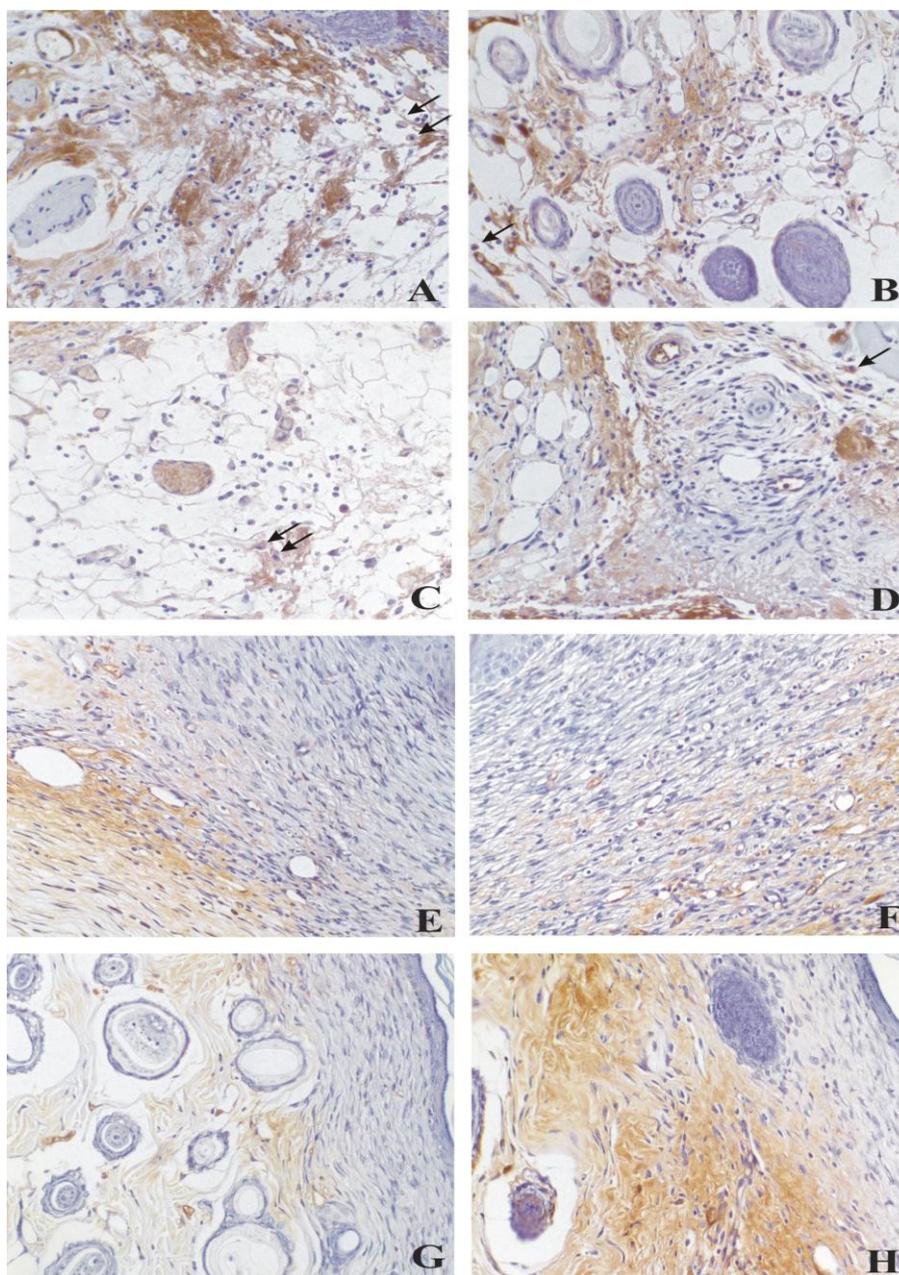
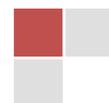


Figura 4 Identificação de macrófagos por imunohistoquímica na pele de camundongos após laserterapia em 1, 3, 7 e 14 dias de tratamento. A) Lesão de um animal do GC1. Nota-se a presença de macrófagos indicados na seta. B) Lesão de um animal do GL1. Presença de único macrófago (seta). C) Lesão de um animal do GC3. Nota-se a



presença de 2 macrófagos indicados na seta. D) Lesão de um animal do GL3. Há presença de um macrófago (seta). E) Lesão de um animal do GC7. Ausência de macrófagos. F) Lesão de um animal do GL7. Observa-se ausência de macrófagos. G) Lesão de um animal do GC14. Não há presença de macrófago. H) Lesão de um animal do GL14. Ausência de macrófagos.

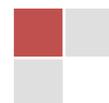
DISCUSSÃO

A eficácia da fototerapia pelo laser de baixa potência já foi estudada no reparo de tecidos moles, como pele (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 2001; MEDRADO et al, 2003; RIBEIRO et al, 2004; PINHEIRO et al, 2006; REIS et al; 2008), músculos (WEISS; ORON, 1992; BIBIKOVA; ORON, 1994; IYOMASA et al, 2009), tendões (SCHMITT et al, 1993; WANDERER et al, 1994; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; RAISER et al, 2003), ligamentos (TAKAHASHI et al, 2002; FUNG et al, 2003; KREISLER et al, 2003), nervos (SHAMIR et al, 2001; BAE et al, 2004; BARBOSA et al, 2010), cartilagem e ossos (TRELLES; MAYAYO, 1987; AKAI et al, 1997).

A densidade de energia de 1J/cm² utilizada em nosso estudo corrobora com Tunér & Hode (2010) que relataram que a utilização do laser terapêutico GaAs a uma densidade de energia de 0,01 a 2J/cm² para tratamento de feridas e dores superficiais é mais eficaz. Eles descreveram que doses mais elevadas podem exercer um efeito inibidor sobre o processo de cura.

Durante o processo de reparo tecidual, os estudos demonstram que a terapia laser promove aumento da proliferação fibroblástica (GARAVELLO-FREITAS et al, 2003; MEDRADO et al, 2003; POURZARANDIAN et al, 2005; NOVOSELOVA et al, 2006; PARKER, 2007), maior expressão de fibras elásticas e colágenas (PUGLIESE et al, 2003) e promoção da angiogênese (GARAVELLO et al, 2004).

O mecanismo dos efeitos no sistema imunológico induzidos pelo laser de baixa potência *in vivo* ainda não está compreendido, mas alguns estudos forneceram evidências das atividades imunomodulatórias desta fototerapia (SHIROTO et al, 1989;



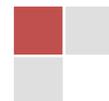
ZHENG et al, 1992; KIPSHIDZE et al, 2001; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; NOVOSELOVA et al, 2006; ARAÚJO et al, 2007).

Há poucos estudos em relação à ação do laser sobre a presença (bem como uma análise quantitativa) de macrófagos *in vivo* (ARAÚJO et al., 2007) e sobre a síntese dos vários tipos de fibras contidas na matriz extracelular (PUGLIESE et al., 2003). Adicionalmente, há ainda a escassez de literatura sobre a ação desta fototerapia em células do sistema imunológico correlacionadas a uma análise histológica completa.

Araújo et al (2007) descreveram que o processo de reepitelização ocorreu mais rápido em lesões de pele de camundongos irradiados pelo laser vermelho ($\lambda 632,8\text{nm}$), em dose única de $1\text{J}/\text{cm}^2$. Eles relataram que aparentemente, a radiação inibiu a resposta inflamatória, observada pelo precoce desaparecimento de neutrófilos. Medrado et al (2003) também encontraram menor reação inflamatória, com diminuição do infiltrado inflamatório, nos animais do grupo laser ($\lambda 670\text{m}$), doses de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$, quando comparados aos animais do grupo controle durante o primeiro dia após a lesão. Isso corrobora com o observado no presente estudo, onde os animais avaliados com 1 dia após lesão do grupo laser apresentavam reação inflamatória mais discreta.

Os animais avaliados no 3º dia após lesão não aparentaram diferença significativa em relação ao processo inflamatório, porém nos animais do grupo controle houve uma reação inflamatória mais discreta do que os animais do grupo laser, semelhante ao relatado por Mendez et al (2004). Assim, os autores concluíram que a laserterapia, utilizada em diversos protocolos diferentes, promove melhor cicatrização de feridas em ratos, caracterizada pelo precoce início e resolução da inflamação. Esse resultado conflita com Medrado et al (2003) que relataram diminuição do infiltrado inflamatório nos animais irradiados pelo laser.

No presente estudo, notou-se que as áreas de edema foram discretamente menores no grupo de animais tratados pelo laser o que corrobora com Medrado et al (2003) que também relatou resultado semelhante neste período pela diminuição do edema nos animais irradiados pelo laser. As áreas de necrose foram mais intensas nos animais do grupo controle, de acordo com Araújo et al (2007) que descreveram que a radiação promoveu precoce desaparecimento da necrose nos primeiros dias de lesão.

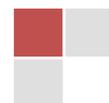


Os animais avaliados 7 dias após a lesão demonstraram que no grupo controle ainda havia um processo inflamatório mais intenso que no grupo laser e um discreto aumento de áreas de edema, o que também já foi observado em outro estudo (ARAÚJO et al, 2007). Ambos os grupos (GC7 e GL7) não demonstraram mais necrose celular. No estudo de Pardo et al (2006), os efeitos de única aplicação do laser infravermelho ($\lambda 830\text{nm}$) com densidade de energia de $36\text{J}/\text{cm}^2$ foram estudados 7 dias após realização do retalho cutâneo isquêmico em ratos e houve significativa redução da necrose das lesões irradiadas.

No grupo de 14 dias após lesão, notou-se inflamação discreta, mais evidente nos animais do grupo controle. Todavia, neste período, a cicatrização estava completa, formada pela nova epiderme, com crescimento de pêlos em todos os animais, o que também foi descrito por outros autores (MEDRADO et al, 2003; ARAÚJO et al, 2007).

Pugliese et al (2003) descreveram uma expressão similar das fibras elásticas ao 7º e 14º dias nos animais do grupo controle e grupo tratado com dose única de laser GaAlAs ($\lambda 670\text{nm}$) em lesões experimentais no dorso de ratos *Wistar*, nas fluências de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$. Esses resultados diferem parcialmente dos encontrados no presente estudo, pois foi observada diferença estatisticamente significativa nos animais dos grupos de 7 dias, com quantidade acentuada de fibras no grupo laser. Todavia, aos 14 dias ambos os grupos apresentavam valores de média semelhantes estatisticamente. Assim sendo, o laser pode auxiliar no processo de formação precoce de fibras elásticas. Embora não existam dados na literatura que indiquem uma possível ação bioestimulante do laser sobre as fibras elásticas nestes períodos, uma vez que a síntese das fibras elásticas é um evento que ocorre cronologicamente mais tarde em comparação com as fibras de colágeno, seria possível encontrar diferenças mais acentuadas entre os grupos se o período estudado fosse prorrogado para 21 a 30 dias (PUGLIESE et al, 2003).

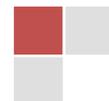
Pugliese e colaboradores (2003) concluíram que a terapia a laser de baixa potência parece aumentar a expressão e organização de fibras colágenas em lesões de pele de ratos, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa estatisticamente entre os grupos controle e tratado com laser. Para Araújo et al (2007), a irradiação pelo laser aparenta ter um efeito na organização das fibrilas de colágeno no compartimento extracelular, sendo que os efeitos benéficos desta terapia foram particularmente



distinguíveis nos dias 8 e 15 após lesão. Mendez et al (2004) também relataram uma maior deposição de colágeno nos animais que receberam laserterapia. Todos esses resultados corroboram com o do presente estudo, pois embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa, observou-se maior expressão das fibras colágenas, com maior tendência a organização no grupo de animais que receberam a terapia a laser 14 dias após a lesão experimental e a instituição do tratamento.

O aumento na expressão e organização das fibras colágenas e elásticas pode ocorrer, segundo Novoselova e colaboradores (2006), devido ao notável o efeito da irradiação do laser na biologia dos fibroblastos. Os autores demonstraram que aos 8 dias após a lesão, os fibroblastos das lesões irradiadas possuíam sinais de alta síntese de proteínas e secreção, além de muitos fagossomos contendo colágeno, indicando compromisso com a degradação da matriz extracelular danificada. A fagocitose das fibras colágenas foi claramente notada nas lesões irradiadas. Um outro estudo demonstrou que as dermes das feridas irradiadas continham fibroblastos grandes e ativados, assim como maior número de miofibroblastos. Adicionalmente, observaram que os fibroblastos dos animais irradiados demonstraram um alto número de fagossomos contidos no colágeno quando comparados com os fibroblastos dos animais não irradiados (ARAÚJO et al, 2007).

O laser de baixa potência modula a função de células imunológicas *in vitro* (NOVOSELOVA et al, 2006). Araújo et al (2007) sugeriram que como a irradiação pelo laser inibe a resposta inflamatória, ocorrendo precoce diminuição do número de macrófagos. Isso corrobora parcialmente com o presente estudo. Neste, não houve diferença significativa no número de macrófagos quando comparados os animais do grupo controle com o grupo laser em cada período de avaliação. Todavia, observou-se no grupo controle um número maior de macrófagos no primeiro dia após a lesão e sua redução gradual, sendo que estatisticamente o valor de p estava muito próximo de demonstrar diferença significativa. Já na comparação evolutiva dos grupos tratados com laser, notou-se que os macrófagos aparecem no primeiro dia no leito da lesão, aumentam no terceiro dia e reduzem apenas no sétimo e décimo quarto dias, sendo essa redução não significativa estatisticamente.



No presente estudo, foi evidente o menor número de macrófagos nos grupos tratados pela laserterapia em todos os períodos avaliados. Estudos demonstram que o laser terapêutico de baixa potência promove estímulo a atividade macrofágica e aumento da atividade fagocítica (BERKI; NÉMETH; HEGEDÜS, 1988; ZHENG et al, 1992; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003). Nesses estudos, foram encontrados aumento da atividade dos marcadores de estimulação de macrófago, como catepsina (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003), quantidade de lisozima (ZHENG et al, 1992; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003) e atividade da fosfatase ácida na lisozima (ZHENG et al, 1992). Lisozima e catepsina são enzimas que regulam os mecanismos celulares citotóxicos (BERKI; NÉMETH; HEGEDÜS, 1988; ZHENG et al, 1992). Outros trabalhos *in vitro* demonstraram que macrófagos irradiados com laser produzem fatores de crescimento capazes de modular a proliferação fibroblástica (YOUNG et al, 1989; RAJARATNAM; BOLTON; DYSON, 1994). Assim, a quantidade de macrófagos pode ser menos importante que a funcionalidade destas células durante o processo de reparo tecidual.

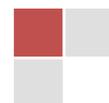
CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem concluir que o laser terapêutico de baixa potência $\lambda = 904\text{nm}$, nas especificações do equipamento utilizado, densidade de energia de $1\text{J}/\text{cm}^2$ conforme o protocolo deste estudo, modifica a infiltração de macrófagos durante o processo de reparo, o que pode estar relacionado com a diminuição progressiva da resposta inflamatória e antecipação do período de formação de fibras elásticas, demonstrando-se eficiente na antecipação do processo de cicatrização cutânea de camundongos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial ao Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/MG).

REFERÊNCIAS



AKAI, M.; USUBA, M.; MAESHIMA, T.; SHIRASAKI, Y.; YASUOKA, S. Lasers effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: an experiment with animal model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 21, n. 5, p. 480-484, mai. 1997.

ARAÚJO, C. E. N.; RIBEIRO, M. S.; FAVARO, R.; ZECELL, D. M.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 2, p. 87-96, fev. 2007.

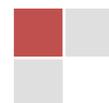
BAE, C. S.; LIM, S. C.; KIM, K. Y.; SONG, C. H.; PAK, S.; KIM, S. G.; JANG, C. H. Effect of Ga-As laser on the regeneration of injured sciatic nerves in the rat. **In vivo**, v. 18, n. 4, p. 489-495, jul./ ago. 2004.

BARBOSA, R. I. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (660nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 294-299, out./dez. 2010.

BERKI, T.; NÉMETH, P.; HEGEDÜS, J. Biological effect of low power laser helium-neon (HeNe) laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 3, n. 1-4, p. 35-39, 1988.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Attenuation oh the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 355-361, fev. 1994.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; IVERSEN, V. V. A Randomized, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentration. **Brasilian Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 1, p.76-80, jan. 2006.



DELAVARY, B. M.; VAN DER VEER, W. M.; VAN EGMOND, M.; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. J. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p.753-762, jul. 2011.

DUBE, A.; BANSAL, H.; GUPTA, P. K. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 2, n. 8, p. 851-855, ago. 2003.

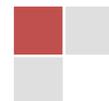
FERREIRA, E.; SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; GOMES, M. G.; SILVA, C. M.; OCARINO, N. M.; RIBEIRO, A. F. C. Morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 51-60, fev. 2003.

FUNG, D. T. C.; NG, G. Y. F.; LEUNG, M. C. P.; TAY, D. K. C. Effects of a therapeutic laser on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. **Lasers in Surgery Medicine**, v. 32, n. 4, p. 286-293, abr. 2003.

GARAVELLO, I.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. da. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 19, n. 1, p. 43-48, Jan. 2004.

GARAVELLO-FREITAS, I. et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology**, Lausanne, v. 70, n. 2, p. 81-89, May/June 2003.

IYOMASA, D. M.; GARAVELO, I.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I.; ISSA, J. P. M. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. **Micron**, v. 40, n. 4, p. 413-418, jun. 2009.



JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemistry Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, jul. 1979.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M. H.; SHANKAR, L. R.; KHANNA, A.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers Surgery Medicine**, v. 28, n. 4, p.355–364, 2001.

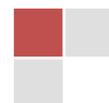
KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p.353-358, abr. 2003.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair – A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **American Journal of Pathology**, v. 78, n. 1, p. 71-100, jan. 1975.

MARCHIONNI, A. M. T.; MEDRADO, A. P.; SILVA, T. M. C.; FRACASSI, L. D.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Influence of laser (λ 670nm) and dexamethasone on the chronology of cutaneous repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 639-646, out. 2010.

MEDRADO, A. R. A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239-244, mar. 2003.

MENDEZ, T. M. et al. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 22, n. 1, p. 19-25, Feb. 2004.



MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2454–2462, dez. 2009.

NOVOSELOVA, E. G.; GLUSHKOVA, O. V.; CHERENKOV, D. A.; CHUDNOVSKY, V. M.; FESENKO, E. E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 22, n. 1, p. 33-38, fev. 2006.

PARKER, S. Low-level laser use in dentistry. **British Dental Journal**, v. 202, n. 3, p. 131-138, fev. 2007.

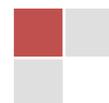
PEREIRA, C. E. M. Contensor Mecânico Para Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 45-51, out./ dez. 2001.

PINHEIRO, A. L. B.; MEIRELES, G. C. S.; CARVALHO, C. M.; VIEIRA, A. L. B.; SANTOS, J. N.; RAMALHO, L. M. P. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 616–624, out. 2006.

POURZARANDIAN, A. et al. Effect of low-level Er: YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 187-193, Feb. 2005.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. Afip laboratory methods in histotechnology. Washington: **American Registry of Pathology**, 1992. 278p.

PUGLIESE, L. S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4,



out./dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-74912003000400003&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 mar. 2012.

RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDIN, A. L.; BAIOTTO, G. C. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária - Pequenos Animais de Estimação**, v. 1, n. 1, p. 23-29, jan./ mar. 2003.

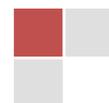
RAJARATNAM, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 6, n. 1, p. 107-112, 1994.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S.; Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 281-287, 1998.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S.; Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 3, p. 248-255, mai./ jun. 2001.

REIS, S. R. A.; MEDRADO, A. P.; MARCHIONNI, A. M. T.; FIGUEIRA, C.; FRACASSI, L. D.; KNOP, L. A. H. Effect of 670nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 307-313, ago. 2008.

RIBEIRO, M. S.; SILVA, D. F. T.; ARAUJO, C. E. N.; OLIVEIRA, S. F.; PELEGRINI, C. M. R.; ZORN, T. M. T.; ZEZELL, D. M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 22, n. 1, p. 59-66, fev. 2004.



SCHMITT, I.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; CASTAGNA, C. D.; GEHVER, C.; MAIORKA, P. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 145-149, 1993.

SHAMIR, M. H.; ROCHKIND, S.; SANDBANK, J.; ALON, M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low power laser treatment. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 2, p. 133-137, fev. 2001.

SHIROTO, C.; SUGAWARA, K.; KUMAE, T.; ONO, Y.; SASAKI, M.; OHSHIRO, T. Effects of diode laser radiation in vitro on activity of human neutrofilis. **Laser Therapy**, v. 1, n. 3, p. 135-140, 1989.

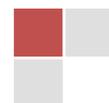
SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 867-874, dez. 2004.

TAKAHASHI, T. et al. Mechanoreceptors and length of the patellar ligament after Ho-YAG laser treatment: a long-term follow-up in rabbits. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Oslo, v. 73, n. 6, p. 653-657, Dec. 2002.

TRELLES. M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 36-45, 1987.

TUNÉR; J.; HODE, L. **The new laser therapy handbook**. Prima Books: Grängesber, 2010. 847p.

WANDERER, C.; BUCHI, D. F.; TASSINI, C. M.; RAISER, A. G.; SCHIMITT, I. Use of lecithins to evaluate the effects of GaAs softlaser on dog tendon. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 27, n. 9, p. 2241-2251, set. 1994.



WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anatomy and Embryology**, v. 186, n. 5, p. 497-503, out. 1992.

YOUNG, S. R.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy, **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, n. 5, p. 497-505, 1989.

ZHENG, H.; QIN, J. Z.; XIN, H.; XIN, S.Y. The activating action of low level helium neon laser radiation on macrophages in the mouse model. **Laser Therapy**, v. 4, p. 55-58, 1992.

