



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - ESTOMATOLOGIA

**INFLUÊNCIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-  
ADRENAL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FERIDAS  
CUTÂNEAS SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO  
LASER**

DEYLA DUARTE CARNEIRO VILELA

SALVADOR-BAHIA

2010

DEYLA DUARTE CARNEIRO VILELA

**INFLUÊNCIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-  
ADRENAL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FERIDAS  
CUTÂNEAS SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO  
LASER**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre na Área de concentração Estomatologia.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Sílvia Regina de Almeida Reis

Salvador-Bahia

2010

**INFLUÊNCIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL  
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FERIDAS CUTÂNEAS  
SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO LASER**

DEYLA DUARTE CARNEIRO VILELA

Folha de Avaliação

Comissão Examinadora

Membros titulares:

**Dra. ALENA PEIXOTO MEDRADO**

Doutora em Patologia Experimental – Fundação Oswaldo Cruz

Profa Adjunta do Núcleo de Estomatologia do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

**Dr. ANTONIO MÁRCIO MARCHIONNI**

Doutor em Laser pela Universidade Federal da Bahia – Universidade Federal da Paraíba

Prof. Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

**Dr. RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR**

Doutor em Patologia Oral pela Universidade do Rio Grande do Norte

Prof. Titular de Diagnóstico Estomatológico Integrado da Universidade de Tiradentes

Prof. permanente do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da UNIT

Pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE)

Membro Suplente:

**Dr. URBINO DA ROCHA TUNES**

Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Titular do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico este trabalho em especial,

Aos meus pais, **Adelmar** e **Udeilda**, por serem meus alicerces de vida e de forma incondicional e sem limites sempre estiveram ao meu lado e foram suportes quando tudo parecia impossível e a força faltava. Pais doadores e guerreiros, meu escudo e fortaleza. Vocês são Amor e exemplos de Vida e a vocês dedico minha eterna gratidão e amor de todo o coração.

Aos meus irmãos, **Mazinho**, **Wagner**, **Leonardo** e **Adalberto**, companheiros e amigos, sempre presentes e participativos na minha caminhada, suportando toda a minha impulsividade. A vocês todo amor por grandes momentos que vivemos juntos.

Ao meu namorado **Stefan**, pela compreensão, apoio, carinho e amor no grande corre-corre que tem sido minha vida. Seu grande companheirismo e incansável incentivo, força, presença e amor, acreditando que sou capaz de vencer!!!

Às minhas cunhadas, cunhados, irmãos, sobrinhos, pais e **Famílias** agregadas, pois nada é mais precioso que se ter e viver em Família.

*“A glória da amizade não é a mão estendida, nem  
o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia.  
É a inspiração espiritual que vem quando você descobre  
que alguém acredita e confia em você.”*

**Ralph Waldo Emerson**

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

***Fernando Pessoa***

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço especialmente;

À Professora, Doutora **Sílvia Regina de Almeida Reis** que muito tem acrescentado à minha vida acadêmica, mostrando-me a profundidade do Ser Professor e o valor da educação. Ensinou-me os primeiros passos a trilhar neste tão rico mundo da pesquisa. Agradeço por todo carinho e dedicação ajudando-me e incentivando-me a buscar sempre mais. Sei que muito ainda tenho a trilhar nessa longa jornada que aqui inicio, mas, desde já agradeço pela importante participação.

*"Não se pode ensinar tudo a alguém.*

*Pode-se, apenas, ajudá-lo a encontrar*

*por si mesmo."*

***Galileu Galilei***



Agradeço também;

A **DEUS**, por ter me concedido o dom da vida, pela Sua graça que se renova dia após dia e por tudo que tem feito por mim. A Ele sou eternamente agradecida por ser o que sou por tudo que tenho e pela benção que é ter uma família.

Aos meus colegas do Mestrado: **Flávia**, por sua presença e apoio durante esta trajetória; **Rebeca**, por ter deixado os momentos mais leves com seu jeito moleque, sua amizade e brincadeiras; **Carine**, por sua tranquilidade e meiguice; **Lara**, por seu carinho e responsabilidade; **Maybel**, por sua seriedade e tranquilidade; **Thais**, com seu jeito sempre preocupado e sério; **Faber**, por ter sido guerreiro como único homem no meio de tantas mulheres. Valeu por esta caminhada juntos, por todas as risadas e brincadeiras. Levarei marcas de cada um de vocês na minha vida.

À professora **Gabriela Botelho Martins** por ser exemplo de Estomatologista e uma amante da profissão. Obrigada pela paciência, estímulo e dedicação. Seu perfil de Mestre é admirável e difícil de encontrar.

À professora **Alena Peixoto Medrado**, por sua seriedade, incentivo e participação nesta jornada árdua e gratificante.

Aos muitos **Mestres** que de alguma forma deixaram marcas em mim da vida acadêmica com sua seriedade e amor ao ato de Ensinar e pela alegria de cada momento.

Ao **Dr. Zilton Andrade**, por ter aberto as portas do LAPEX, e me acolhido de forma muito querida e solícita.

À **Ana Cristina Gonzalez** por sua paciência, ajuda e amizade durante a pesquisa. Sua alegria e brincadeiras tornaram os momentos mais leves.

Aos **funcionários** da **EBMSP** e **FIOCRUZ** pelo apoio e atenção. Em especial a **Josy** e **Débora** que com jeitinho especial e muitas risadas sempre estiveram dispostas a ajudar; **Walter**, **Evandro** e **Thais**. E aos **pacientes** pela oportunidade do aprendizado.

Aos meus queridos **Amigos** que estiveram sempre ao meu lado e na torcida pelo meu sucesso, entendendo a minha ausência e apoiando as minhas escolhas. Em especial à amiga **Priscilla Lôbo**, pelos momentos juntas, pelo apoio incondicional e brincadeiras, pela amizade, amor e carinho.

Ao amigo e Mestre **Alexandre Mascarenhas Villela**, por ser um dos responsáveis por este caminho que hoje trilho. Seu apoio e amizade sempre especial.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

*"Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração  
de segundos, mas com tamanha intensidade,  
que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata."*

***Carlos Drummond de Andrade***

## **INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

---

## **INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Curso de Odontologia

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - CPqGM

Laboratório de Patologia Experimental – LAPEX

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{cm}^2$	-	Centímetro(s) quadrado(s)
$\text{mm}^2$	-	Milímetro(s) quadrado(s)
g	-	Gramas(s)
GaAIs	-	Arseneto de Gálio e Alumínio
JPEG	-	Joint Photographic Expert Group
$\text{J}/\text{cm}^2$	-	Joule(s) por centímetro(s) quadrado(s)
LLLT	-	Terapia Laser de Baixa Potência
mm	-	Milímetro(s)
mW	-	Miliwatt(s)
nm	-	Nanômetro(s)
n°	-	Número
W	-	Watt(s)
$\text{W}/\text{cm}^2$	-	Watt(s) por centímetro quadrado
$\lambda$	-	Comprimento de onda
$\mu\text{m}$	-	Micrômetro(s)
ACTH	-	Hormônio Adrenocorticotrópico
ATP	-	Adenosina trifosfato
IL-1 $\beta$	-	Interleucina 1 beta
IL-6	-	Interleucina 6

---

## **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células CD45 positivas no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas ..... 45
- Tabela 2. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células T CD8 no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas ..... 47
- Tabela 3. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células T CD8 e CD45 no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas ..... 50
- Tabela 4. Distribuição da expressão da matriz de colágeno no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas ..... 51



## **LISTA DE FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incisões paralelas no dorso do animal .....	40
Figura 2. Localização da glândula adrenal .....	40
Figura 3. Excisão da glândula adrenal .....	40
Figura 4. Ferida circular e <i>punch</i> .....	41
Figura 5. Aplicação do laser AsGaAl .....	42
Figura 6. Aplicações pontuais do laser .....	42
Figura 7. Remoção de tecido cutâneo .....	42
Figura 8. Células CD45 positivas. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm .....	46
Figura 9. Células CD45 positivas. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50µm .....	46
Figura 10. Linfócitos T CD8. Grupo controle, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm .....	48
Figura 11. Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm .....	48
Figura 12. Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm .....	49
Figura 13. Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50µm .....	49
Figura 14. Expressão da matriz de colágeno com presença de fibras organizadas e paralelas entre si. Grupo laser, 72 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm .....	52
Figura 15. Expressão da matriz colagênica. Não se observa o padrão organizacional do colágeno encontrado na presença da glândula adrenal. Grupo laser, 72 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50µm .....	52

## **SUMÁRIO**

---

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	22
2. Manuscrito 1 .....	23
2.1 Introdução .....	26
2.2 Revisão da Literatura .....	26
2.2.1 Processo inflamatório .....	26
2.2.2 Componentes celulares que participam da resposta inflamatória .....	27
2.2.3 Cicatrização e reparo tecidual .....	29
2.2.4 Eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o cortisol endógeno .....	30
2.2.5 O laser de baixa potência como agente modulador do processo cicatricial .....	31
2.3 Considerações Finais .....	33
2.4 Abstract .....	33
2.5 Referências Bibliográficas .....	33
3. Manuscrito 2 .....	36
3.1 Introdução .....	39
3.2 Material e Métodos .....	39
3.2.1 Animais .....	39
3.2.2 Procedimentos cirúrgicos .....	40
3.2.3 Grupos experimentais .....	41
3.2.4 Processamento histológico e técnica imuno-histoquímica.....	42
3.2.5 Análise dos dados .....	44
3.3 Resultados .....	44
3.3.1 Expressão de Células CD45, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea .....	44
3.3.2 Expressão de Células T CD8, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea .....	47
3.3.3 Expressão de Células T CD8 e CD45, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea ....	50
3.3.4 Expressão da matriz colagênica, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea .....	51
3.4 Discussão .....	53
3.5 Conclusões .....	56

3.6 Abstract .....	56
3.7 Referências Bibliográficas .....	57
3.8 Anexo 1 .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação representa uma fase crítica do reparo tecidual e é desencadeada em resposta a um agente etiológico. Esse processo caracteriza-se por um mecanismo básico de defesa e envolve um amplo leque de eventos, podendo seu curso ser modulado por diversos fatores. Co-adjuvantes como fármacos e terapias fotobiomoduladoras podem ser utilizadas no intuito de minimizar efeitos deletérios do processo inflamatório e cooperar na melhora do reparo tecidual.

Este trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, sob o título “Influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na resposta inflamatória de feridas cutâneas submetidas à fotobiomodulação laser” é composto por dois manuscritos.

No Manuscrito 1, intitulado “Fotobiomodulação laser e o Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Inflamação Aguda – Revisão da Literatura” foi realizada uma análise das publicações a cerca do processo inflamatório, da sua interação com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e da influência do laser de baixa potência no processo cicatricial.

O Manuscrito 2 representa o trabalho de pesquisa laboratorial que teve como objetivo analisar, histologicamente, a influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) na expressão imuno-histoquímica de células CD45 e T CD8. Adicionalmente, objetivou-se verificar a expressão de matriz colagênica sob a influência desta fototerapia na ausência e presença de glândulas adrenais.

## **2. MANUSCRITO 1**

---

## **Fotobiomodulação laser e o Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Inflamação Aguda – Revisão da Literatura**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado em Estomatologia – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito para a qualificação do Mestrado em Estomatologia.

Deyla Duarte Carneiro Vilela \*

Alena Peixoto Medrado \*\*

Sílvia Regina de Almeida Reis \*\*\*

\* Aluna do Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado em Estomatologia – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

\*\* Professora Adjunta Doutora do Núcleo de Estomatologia do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

\*\*\* Professora Adjunta Doutora do Núcleo de Ciências Básicas do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Deyla Duarte Carneiro Vilela

e-mail: deylavilela@yahoo.com.br



## **Fotobiomodulação laser e o Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Inflamação Aguda – Revisão da Literatura**

### **RESUMO**

[Objetivo] Este trabalho objetiva promover uma revisão de literatura a cerca dos conceitos do uso terapêutico do laser de baixa potência e a influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal nos eventos inerentes à cicatrização de feridas cutâneas. [Resultados] O laser age melhorando o reparo tecidual, através de fenômenos como aumento da proliferação celular, síntese de colágeno e promovendo um melhor padrão de organização das fibras colágenas e, minimizando os efeitos da inflamação aguda. Um dos mecanismos sugeridos na literatura sobre a ação do laser se dá com liberação de cortisol pelas glândulas adrenais com efeitos benéficos na cicatrização de feridas na presença de glândulas adrenais intactas. [Conclusões] Diante da revisão realizada da literatura pode-se concluir que são necessários mais estudos que elucidem a ação do laser no período agudo do processo inflamatório na ausência das glândulas supra-adrenais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inflamação, Terapia a laser de baixa potência, Cicatrização de Feridas

## 2.1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta inespecífica do corpo a diversas lesões e caracteriza-se como uma proteção que inicia o processo de reparo tecidual. Durante este evento ocorrem várias modificações como, por exemplo, alteração na matriz extracelular. A fotobiomodulação laser é um importante método estimulador no tratamento dos processos cicatriciais e tem sido considerada uma alternativa importante por apresentar ação reguladora sobre a resposta inflamatória, reduzindo a sintomatologia dolorosa e estimulando o reparo tecidual.

O laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) tem sido objeto de estudo de muitos investigadores e, em 2003 MEDRADO<sup>1</sup> *et al.* demonstraram que este tipo de terapia luminosa acelera a fase aguda da inflamação e aumenta a contração de feridas cutâneas e a expressão de miofibroblastos. Outros estudos subsequentes ratificaram estes achados utilizando inclusive diferentes comprimentos de onda e outras modalidades de luz<sup>2-4</sup>.

O uso da fotoradiação é comum no tratamento das desordens inflamatórias e, estima-se que um dos mecanismos de ação do laser de baixa potência seja o estímulo à liberação de cortisol endógeno, secretado pelas glândulas adrenais, exercendo assim efeito antiinflamatório<sup>5</sup>. Diante disto, este trabalho objetiva promover uma revisão de literatura a cerca dos conceitos do uso terapêutico do laser de baixa potência e a influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal nos eventos inerentes à cicatrização de feridas cutâneas.

## 2.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2.1 Processo inflamatório

A inflamação consiste em reação do sistema imunológico inato, que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo, nos tecidos vascularizados e envolve o acúmulo e a ativação de células e proteínas plasmáticas em um local de infecção, exposição à toxina ou lesão celular<sup>6,7</sup>. A inflamação é tradicionalmente definida pelas quatro palavras latinas: dor, rubor, calor e tumor, refletindo os efeitos das citocinas e de outros mediadores inflamatórios sobre os vasos sanguíneos locais. A vasodilatação e permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos durante a inflamação levam ao aumento do fluxo de sangue local e ao extravasamento de fluidos e migração de células. Os principais tipos celulares vistos em uma resposta inflamatória em sua fase inicial são os neutrófilos. O influxo destas células é seguido pelos monócitos que

rapidamente se diferenciam em macrófagos. Mais tarde a resposta inflamatória também envolve os linfócitos<sup>8-10</sup>.

Na etapa aguda ou inicial do processo inflamatório participam moléculas pró-inflamatórias importantes para induzir a cascata de eventos posteriores, como a migração celular e a síntese de matriz extracelular. Esta matriz provisória pode ser alterada por vários fatores, tanto inibidores quanto estimuladores, alterando o curso da inflamação e, eventualmente a fibrinogênese<sup>3,7,8,10-12</sup>.

Os linfócitos aparecem na fase inicial do processo inflamatório, mas vão gradativamente aumentando em número durante a fase crônica e constituem as células mais abundantes nas feridas neste momento<sup>7,8,13</sup>. Há em seguida a participação dos principais elementos do remodelamento tecidual, os fibroblastos e os macrófagos<sup>12</sup>.

O processo normal de reparação dos tecidos moles envolve as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. A fase homeostática ocorre imediatamente após o aparecimento da lesão e depende de plaquetas no sangue e atividade do processo de coagulação, que inclui um complexo de libertação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas e fatores de crescimento para o desenvolvimento de outros estágios<sup>14</sup>. Mais tarde, o processo inflamatório em conjunto com a presença de inúmeros mediadores químicos e de células inflamatórias são os responsáveis pela remoção de tecidos necróticos e combate agentes agressivos instalados na ferida<sup>15</sup>.

### **2.2.2 Componentes celulares que participam da resposta inflamatória**

Os glóbulos brancos ou leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo. São encontrados no sangue, na linfa e nos tecidos. São classificados em granulócitos por possuírem granulações citoplasmáticas a exemplo dos neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Já os que não possuem granulações são conhecidos como agranulócitos como os monócitos e linfócitos<sup>16</sup>.

Em relação às células polimorfonucleares, os neutrófilos são os mais numerosos e caracterizam-se por serem fagócitos ativos. São as primeiras células a chegarem ao local da ferida depois da agressão. Sua atividade celular tem por consequência a destruição tecidual associada<sup>17</sup>. Constitui importante defesa celular contra a invasão de microrganismos. Em seu citoplasma os grânulos específicos são azurófilos, compostos de hidrolases. Têm núcleos formados por dois a cinco lóbulos ligados por finas pontes de cromatina. Apresenta síntese protéica limitada, poucas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, raros ribossomos livres,

poucas mitocôndrias e aparelho de Golgi rudimentar. Os eosinófilos são fagócitos que apresentam receptores de superfície para as imunoglobulinas E (IgE) sendo pouco ativos e com atividade defensiva realizada pela liberação do conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular e pela fagocitose e destruição de complexo antígeno-anticorpo. Possuem a propriedade de neutralizar as substâncias liberadas pelos tecidos lesados, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandina. São menos numerosos do que os neutrófilos, mas apresentam aproximadamente o mesmo tamanho. A meia-vida dos eosinófilos no sangue é de 8 a 18 horas, porém podem sobreviver, por semanas, nos tecidos. Seu núcleo em geral é bilobulado e sua principal característica é a presença de granulações ovóides acidófilas. São atraídos para as áreas de inflamação alérgica pela histamina, produzida principalmente por basófilos e mastócitos. Já os basófilos assemelham-se aos mastócitos encontrados na parte externa de muitos capilares. Tem núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular, geralmente com o aspecto da letra S. O citoplasma é carregado de grânulos maiores do que os dos outros granulócitos, os quais muitas vezes obscurecem o núcleo. Os grânulos são metacromáticos e contêm histamina, fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos, e heparina, que é responsável pela metacromasia do grânulo além de ser um anticoagulante intravascular<sup>8,16,18</sup>.

Em relação às células monomorfonucleares, os linfócitos constituem 25-35% do total de células brancas e suas subclasses são caracterizadas pelas diferentes respostas a antígenos. Os linfócitos circulantes no sangue e na linfa se originam principalmente no timo e nos órgãos linfóides periféricos como baço, linfonodos e tonsilas, a partir de células trazidas da medula óssea pelo sangue. São classificados em dois tipos principais de acordo com o local onde se diferenciam e com os diferentes receptores presentes em suas membranas. Nos linfócitos B, esses receptores são imunoglobulinas e nos linfócitos T são moléculas protéicas chamadas TCR (receptor de antígeno da célula T)<sup>8,11-13,16,18</sup>.

A população de linfócitos T é heterogênea nas suas capacidades funcionais. Juntamente com os macrófagos, estas células T constituem os tipos celulares envolvidos na imunidade mediada por células. A migração destas para a ferida, depois das células inflamatórias e macrófagos, ocorre no quinto dia após a agressão, durante a fase proliferativa<sup>17</sup>. São de modo geral divididas em: células auxiliares, que promovem as respostas celulares e humorais, como proliferação, maturação e função imunológica de outros tipos celulares; e, células citotóxicas que possuem a capacidade de destruir as células-alvo que possuem antígenos. As células T auxiliares geralmente expressam CD4, enquanto que as células T citotóxicas expressam CD8<sup>19-21</sup>. A característica que define as células B consiste na sua capacidade de sintetizar

proteínas denominadas imunoglobulinas. Nos linfócitos B em repouso, as imunoglobulinas são expressas apenas na superfície celular, onde atuam como receptores para antígenos específicos. Já as células efectoras da linhagem B, plasmócitos, estão exclusivamente especializadas na secreção de anticorpos para o meio circulante. Nestes linfócitos, as organelas secretoras de proteínas estão bem representadas, incluindo um grande aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso abundante<sup>13,22</sup>.

Já os macrófagos são células de vida longa e podem sobreviver por meses nos tecidos. Têm sua predominância na ferida 48 a 96 horas após a agressão<sup>17</sup>. Atuam como um dos tipos celulares mais importantes da iniciação da fase aguda com capacidade de fagocitose e de secretar substâncias que participam nas funções de defesa e reparo dos tecidos<sup>7,23</sup>. Podem se arranjar em grupos formando células epitelióides ou fundir-se para formar células gigantes de corpo estranho. Quando os monócitos cruzam as paredes de vênulas pericíticas e capilares e penetram no tecido conjuntivo, amadurecem e adquirem as características morfológicas de macrófagos, que constituem uma fase mais avançada na vida da célula mononuclear fagocitária<sup>8,16,24</sup>. O macrófago tecidual tem um tempo de sobrevivência de cerca de 2-4 meses e durante este período podem permanecer imóveis ou vagando incessantemente por movimento amebóide. Sempre que em contato com certos mediadores da inflamação ou outros sinais de lesão tecidual, a célula é ativada caracterizando-se por um rápido aumento de seu metabolismo, motilidade e atividade fagocítica<sup>24</sup>. A maior contribuição dos macrófagos para a cicatrização de feridas é a secreção de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a inflamação, influenciando tanto a resposta humoral como a resposta celular<sup>24</sup>. Além disso, elas agem também sobre as células de outros sistemas que possuem receptores apropriados, participando da resposta inflamatória, da cicatrização das feridas, da hemocitopoese e de outros processos biológicos<sup>8,11,18</sup>.

### **2.2.3 Cicatrização e reparo tecidual**

Os eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para o tamponamento dos vasos sanguíneos seguido de uma complexa interação molecular para permitir que mecanismos essenciais aconteçam, como por exemplo, a migração, proliferação e diferenciação celulares bem como interações entre célula e matriz. Todas estas respostas são mediadas por substâncias oriundas do plasma, das células do conjuntivo, do endotélio, dos leucócitos e plaquetas, que regulam a inflamação. Estes mediadores formam um gradiente quimiotático que orientam a migração das células envolvidas<sup>7,8,12</sup>.

Em seguida na cicatrização de feridas por segunda intenção há proliferação tecidual, que é responsável por "fechar" a ferida, em conjunto com a reepitelização, a fibroplasia, precedidos por formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II e, a angiogênese, essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários para a cicatrização. Finalmente, há contração da ferida, com participação dos miofibroblastos e síntese de elementos da matriz extracelular<sup>1,7,15</sup>.

Uma outra estrutura importante no processo de cicatrização de feridas é a presença das fibras do tecido conjuntivo formadas por proteínas que se polimerizam formando estruturas muito alongadas. Os três tipos principais de fibras do tecido conjuntivo são as colágenas, mais numerosas no tecido conjuntivo, as reticulares e as elásticas formadas por diferentes tipos de colágeno que constitui na proteína mais abundante do organismo. Com a evolução do processo de cicatrização observa-se uma modificação na matriz extracelular que favorece a diferenciação fenotípica de fibroblastos em células mais maduras, com citoplasma mais volumoso e retículo endoplasmático rugoso abundante, secretando grandes quantidades de colágeno<sup>7,18</sup>.

#### **2.2.4 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e cortisol endógeno**

Concomitantemente a ação das células do processo inflamatório, hormônios esteróides são liberados influenciando a resposta inflamatória, produzidos pelo córtex das glândulas supra-renais<sup>25</sup>. Estes hormônios são essenciais para a sobrevivência e classificam-se em mineralocorticóides, glicocorticóides e andrógenos<sup>26,27</sup>.

O sistema imune e neuroendócrino estão interligados como um mecanismo de regulação recíproca. O curso da inflamação é modulado por um aumento na concentração de glicocorticóides no plasma<sup>28</sup>. Os corticotrófos secretam, principalmente, o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o qual controla a produção e a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides causam inibição, por "feedback" negativo, da liberação, tanto do hormônio secretor de corticotropina, como do ACTH<sup>23</sup>. Após a exposição à citocinas inflamatórias o eixo é estimulado a liberar o cortisol, que por sua vez irá regular a resposta imune. As citocinas inflamatórias, como as IL-1beta e IL-6, ativam a glândula adrenal resultando em um rápido aumento dos níveis séricos de cortisol endógeno<sup>29-31</sup>.

O cortisol ou hidrocortisona é o mais abundante dos glicocorticóides e responsável por cerca de 95% dos efeitos antiinflamatórios<sup>31,32</sup>. Quando os tecidos sofrem lesão por traumatismo,

infecção bacteriana ou qualquer outra causa, o processo inflamatório gerado pode ser atenuado pela presença do cortisol endógeno.

Em relação à sua ação anti-flogística citam-se a capacidade de causar estabilização das membranas lisossômicas intracelulares o que gera redução na quantidade de enzimas proteolíticas liberadas; diminuição da permeabilidade dos capilares impedindo perda de plasma para os tecidos; diminuição da migração dos leucócitos para a área inflamada, bem como a fagocitose das células lesadas; capacidade de suprimir o sistema imune, determinando acentuada redução da reprodução dos linfócitos que reduzindo células T e anticorpos na área promove ainda mais o processo inflamatório; redução da liberação de interleucina-1 dos leucócitos, um dos principais estimulantes dos sistemas de controle hipotalâmico da temperatura, a diminuição da temperatura reduz, por sua vez, o grau de vasodilatação<sup>32</sup>.

A perda completa dos hormônios adrenocorticais leva a desequilíbrios eletrolíticos, dentro de poucos dias a uma semana. Por conseguinte, os mineralocorticóides são considerados como a porção “protetora da vida” dos hormônios córtico-supra-renais, enquanto que os glicocorticóides são igualmente necessários, permitindo ao indivíduo resistir aos efeitos destrutivos dos “estresses” físicos e mentais<sup>31,32</sup>. Sua deficiência, pela adrenalectomia, pode ser considerada um importante fator durante o desenvolvimento da fase aguda inflamatória aumentando a patogênese através do distúrbio do sistema imune do hospedeiro<sup>27</sup>. Como consequência observa-se concentração maior de TNF alfa, diminuição da quimiotaxia para a migração e liberação das enzimas mieloperoxidasas e lisozima pelos macrófagos<sup>29,33</sup>.

### **2.2.5 O laser de baixa potência como agente modulador do processo cicatricial**

A palavra Laser é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission Radiation”, que tem como significado “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”. É uma avançada fonte de luz, na qual a energia é transformada em energia luminosa. Pode ser classificado em laser de alta e de baixa intensidade. Os de baixa intensidade, conhecidos como lasers terapêuticos, têm sua potência de até 1 watt e, têm sua utilização relacionada a tratamentos em que se espera a modulação da resposta tecidual. E os de alta intensidade são radiações emitidas com alta potência acima de 1 watt e sua ação fototérmica é por corte, vaporização, coagulação e esterilização dos tecidos<sup>34,35</sup>.

Através da busca de procedimentos que possam minimizar o edema, dores e ainda estimular o processo de reparo tecidual, por meio da fotobiomodulação celular, muitas são as terapias que surgem em decorrência dos grandes avanços nas áreas médicas e odontológicas, sendo a

utilização do laser uma delas.

Medrado *et al.* (2003)<sup>1</sup> e Pugliese *et al.* (2003)<sup>36</sup>, em estudos semelhantes realizados em feridas cutâneas de ratos com utilização do laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), puderam verificar melhora qualitativa na cicatrização quando utilizada uma dosimetria de 4 J/cm<sup>2</sup>. Observaram maior indução de colágeno e das fibras elásticas com deposição mais ordenada e, sem diferença estatística.

A terapia com laser de baixa potência é um importante método de tratamento nos processos cicatriciais<sup>37</sup>. Pode ser efetivo no processo inflamatório, diminuindo os sintomas, como o edema e infiltrado polimorfonuclear<sup>3,36,38</sup> e a dor, acelerando ainda o processo de cicatrização pós-cirúrgica, estimulando eventos durante as fases inflamatória e proliferativa, através do aumento na síntese de colágeno<sup>3,39,40</sup>. Restaura ainda as células após inibição farmacológica<sup>39</sup> e gera uma melhora no padrão cicatricial, incluindo um aumento no número de miofibroblastos no leito do ferimento<sup>1</sup>, favorecendo uma aceleração do processo cicatricial, permitindo um fechamento primário com contração das bordas da ferida<sup>41</sup>.

Na cicatrização tecidual destacam-se três principais efeitos da terapia com laser de baixa potência: primeiro, o aumento na produção de ATP<sup>42</sup>, levando a um aumento na atividade mitótica e aumento na síntese protéica pelo retículo endoplasmático rugoso, que resulta em maior regeneração tecidual no processo de reparação; segundo, há um estímulo à microcirculação, o que permite aumento de elementos nutritivos disponíveis nos tecidos, associado ao aumento da velocidade de mitoses, facilitando a multiplicação celular e; por último, novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes<sup>15,40,43</sup>.

A proliferação celular endotelial desempenha um papel chave no processo de reparação tecidual. A irradiação laser de baixa intensidade tem sido utilizada para acelerar cicatrização e melhorar a microvascularização<sup>40,42,44</sup>, portanto uma melhora da circulação sistêmica logo após o início da exposição à luz se reflete no local da ferida<sup>45</sup>. Pode ainda ser eficiente na terapia de alguns tipos de feridas persistentes, como em casos de úlcera crônica dolorosa podendo verificar-se a diminuição da sintomatologia com subsequente presença de tecido de granulação e reepitelização<sup>46</sup>.

Um dos mecanismos sugeridos para a atividade do laser de baixa potência sobre a inflamação é o estímulo à secreção de cortisol endógeno, hormônio liberado pelas glândulas supra-adrenais que age como anti-inflamatório natural<sup>5</sup>. Além disso, o efeito benéfico do laser como um antiinflamatório está ligado a uma adrenal intacta e a resposta não teria lugar na ausência de corticosteróides endógenos por inibição do efeito antiinflamatório da fotoradiação na presença de antagonista do receptor de esteroides<sup>6</sup>.



## 2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomodulação laser contribui de forma favorável para a evolução da fase inicial do processo inflamatório e acelera a cicatrização dos tecidos. Através de revisão bibliográfica pouco se tem relatos a respeito da influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na resposta inflamatória de tecidos submetidos à terapia com laser de baixa potência em animais adrenalectomizados e não adrenalectomizados.

## 2.4 ABSTRACT

[Aims] This study aims to provide a review of literature about the concepts of therapeutic use of low power laser and the influence of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the events involved in wound healing. [Results] The laser acts by improving the tissue repair, through phenomena such as increased cell proliferation, collagen synthesis and promoting a better organization pattern of collagen fibers, and minimizing the effects of acute inflammation. The laser action occurs with the release of cortisol by the adrenal glands and would only have beneficial effects on wound healing in the presence of intact adrenal glands. [Conclusion] In view of the literature review we can conclude that further studies are needed to elucidate the action of the laser during acute inflammation in the absence of supra-adrenal glands.

**KEY WORDS:** Inflammation, Low level laser therapy, Wound Healing

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003;32:239-244.
2. Medrado ARAP, Soares AP, Santos E, Reis SRA, Andrade Z. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* 2008, 92: 144-52.
3. Reis SRA, Medrado A, Marchionni AM, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670 nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomedicine & Laser Surgery.* 2008,26:305-10.
4. Pinheiro ALB, Pozza DH, Oliveira MG, Weissmann R, Ramalho LMP. Polarized Light(400-2000 nm) and Non-ablative Laser(685nm): A description of the Wound Healing Process using Immunohistochemical analysis. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2005, 23(5):485-92.
5. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes-Martins PSL, Carvalho FAZ, Neto HCCF, Iversen VV, *et al.* Steroid Receptor Antagonist Mifepristone Inhibits the Anti-inflammatory Effects of Photoradiation. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2006, 24(2): 197-201.
6. Albertini R, Ambiere FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zângaro RA, Lopes-Martins RAB. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *Journal of*

- Photochemistry and Photobiology B: Biology 2004; 74:101-7.
7. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 2005;41(1):27-51.
  8. Consolaro A. *Inflamação e Reparo*. 1 ed. Maringá: Dental Press Editora, 2009.
  9. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia-O sistema imune na saúde e na doença*. 5 ed. Porto Alegre: Editora Artemed, 2002.
  10. Martin P. Wound Healing- Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997, 276:75-81.
  11. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005.
  12. Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127:514-25.
  13. Schaffer M, Barbull A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *British Journal of Surgery* 1998;85:444-60.
  14. Contran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 44-100.
  15. Rocha Jr AM, Vieira BJ, Andrade LCF, Aarestrup FM. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras* 2007; 6 (3):258-66.
  16. Singi G. *Fisiologia para Odontologia*. 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
  17. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2004, 187:11S-16S.
  18. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
  19. Leahy DJ. A structural view of CD4 and CD8. *The FASEB Journal* 1995;9:17-25.
  20. Peakman M, Vergani D. *Imunologia Básica e Clínica*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999.
  21. Romagnani S. Th1/Th2 Cells. *Inflamattory Bowel Diseases*. 1999;5(4):285-294.
  22. Stites D, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2001.
  23. Webster JI, Sternberg, EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxis sequelae of exposure to bacterial and viral products. *Journal of Endocrinology* 2004: 181, 207-221.
  24. Parslow TG, Stites DP, Terr AL, Imboden JB. *Imunologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
  25. Brandt J, Luhder F, McPherson KG, Graaf KL, Tischner D, Wiehr S et al. Enhanced Glucocorticoid Receptor Signaling in T Cells Impacts Thymocyte Apoptosis and Adaptive Immune Responses. *AJP March* 2007; 170 (3) 1041-53.
  26. Freel EM, Bernhardt M, Ingramt R, Wallace AM, Fraser R, Davies E, *et al*. Endogenous corticosteroids biosynthesis in subject after bilateral adrenalectomy. *Clinical Endocrinology*. 2007;66, 659-665.
  27. Guerra-Lopes ES, Caldeira JC, Santos CD, Toldo MPA, Faccioli LH, Sá-Nunes A, *et al*. Trypanossoma cruzi: Effects of adrenalectomy during the acute phase of experimental infection. *Experimental Parasitology*, 2008;120:10-14.
  28. Cavalcanti DMH, Lotufo CMC, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SHP. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *British Journal of Pharmacology*. 2007;152:1291-1300.
  29. Ruzek MC, Pearce BD, Miller AH, Biron CA. Endogenous Glucocorticoids Protect Against Cytokine-Mediated Lethality during Viral Infection. *The Journal of*

- Immunology. 1999;162:3527-33.
30. Papasian CJ, Qureshi N, Morrison DC. Endogenous and Exogenous Glucocorticoids in Experimental Enterococcal Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(3):349-355.
  31. Tortora GJ, Grabowski SR. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 534-538, 2009.
  32. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. São Paulo:Editora Elsevier, 2006.
  33. Bishayi B, Ghosh S. Immunobiological changes of in vivo glucocorticoid depleted male Swiss albino rats. *Immunobiology*. 2007; 212:19-27.
  34. Arndt KA, Noe JM, Northam DBC, Itzkan I. Laser Therapy. *J Am Acad Dermatol* 1981, 5:649-654.
  35. Túner RJ, Holde L. *Low Level Laser Therapy. Clinical Practice and Scientific Background*. Prima Books: Suécia, 1999.
  36. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):307-13.
  37. Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, Taheri S, Rakhsan M. (2005). Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: a histological and microbiological study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78:171-7.
  38. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Jr. JA, Costa MS. Cox-2 mRNA expression decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm. Res*.2007;56:228-229.
  39. Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JGP, Barros, LAP, Moysés MR. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40:877-84.
  40. Genovese WJ. *Laser de baixa intensidade – Aplicações terapêuticas em Odontologia*. São Paulo: Santos; 2007.
  41. Lucroy MD, Edwards BF, Madewell BR. Low-intensity laser light-induced closure of a chronic wound in a dog. *Veterinary Surgery* 1999; 28: 292-95.
  42. Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Stefan Mozes DVM, Frantisek Longauer MD. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006;24(4):480-88.
  43. Bourguignon-Filho AM, Feitosa ACR, Beltrão GC, Pagnoncelli RM. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2005; 46(1), 37-43.
  44. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *British Journal of Dermatology* 2003; 148:334-6.
  45. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvascular Research* 2002; 64:240-6.
  46. Schindl A, Schindl M, Schindl L. Successful treatment of a persistent radiation ulcer by low power laser therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1997; 37(4) Oct.

### **3. MANUSCRITO 2**

---

## **Influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na resposta inflamatória de feridas cutâneas submetidas à fotobiomodulação laser**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado em Estomatologia – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito para a qualificação do Mestrado em Estomatologia.

Deyla Duarte Carneiro Vilela \*

Flávia Villela Chamusca \*

Camila Monteiro Campos \*\*

Ana Cristina Gonzalez \*\*\*

Alena Peixoto Medrado \*\*\*\*

Sílvia Regina de Almeida Reis \*\*\*\*\*

\* Alunas do Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado em Estomatologia – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

\*\* Acadêmica de Odontologia, Bolsista de iniciação científica da Escola Bahiana Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

\*\*\* Bióloga do Laboratório de Pesquisa Experimental do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz - FIOCRUZ (UFBA)

\*\*\*\* Professora Adjunta Doutora do Núcleo de Estomatologia do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

\*\*\*\*\* Professora Adjunta Doutora do Núcleo de Ciências Básicas do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Deyla Duarte Carneiro Vilela

e-mail: deylavilela@yahoo.com.br

## **Influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na resposta inflamatória de feridas cutâneas submetidas à fotobiomodulação laser**

### **RESUMO**

[Objetivos] Analisar o processo inflamatório agudo e a influência do eixo HPA na cicatrização de ferimentos cutâneos submetidos à biomodulação laser. [Metodologia] Quarenta e oito ratos foram divididos em 2 grupos, adrenalectomizados (GI) e não adrenalectomizados com 24 ratos cada constituídos por 2 subgrupos, irradiado e controle, de 12 animais, sendo que 6 animais de cada subgrupo foram mortos 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea. Todos os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para localização das glândulas adrenais, mas, apenas os animais do GI tiveram as mesmas removidas. Após 3 dias da adrenalectomia, foi realizada a ferida cutânea. Análise imuno-histoquímica com marcadores anti-CD45 e anti-CD8 foi realizada com o tecido cutâneo. Os dados foram coletados e analisados pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney. [Resultados] Nos animais com a glândula adrenal removida houve diferenças estatísticas no período de 24 horas no grupo laser com menor contingente de células totais e CD45 positivas em relação ao controle e, quando comparados os grupos laser entre os períodos estudados para as células CD8. Ainda, quando comparada a expressão das células entre os grupos controles com adrenal preservada e removida em 24 horas houve diferenças tanto para as CD45 como para as CD8 e totais. [Conclusões] A biomodulação laser modifica a expressão de células CD8 e CD45 e, apenas qualitativamente, a expressão de colágeno durante a inflamação aguda após a realização de feridas cutâneas em ratos na ausência e presença de adrenais. A ação do laser não depende exclusivamente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

**PALAVRAS-CHAVES:** Inflamação, laser, adrenal, CD8, CD45.

### **3.1 INTRODUÇÃO**

O laser apresenta efeito estimulatório nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas, influenciando o comportamento de muitos tipos de células inflamatórias e acelera a dinâmica do reparo na presença de glicocorticoides<sup>1</sup>. Contudo, o laser sozinho demonstra acelerar a reparação tecidual pós-cirúrgica, reduzindo edema e infiltrado polimorfonuclear, redução da migração de células inflamatória e é capaz de estimular a cicatrização de feridas, aumentando a expressão e organização de fibras colágenas e elásticas e matriz extracelular, incluindo um aumento do número de miofibroblastos no leito do ferimento<sup>2,3,4,5</sup>.

Como na literatura sugere-se o mecanismo para a atividade do laser de baixa potência, sobre a inflamação, é o estímulo à secreção de cortisol endógeno, hormônio liberado pelas glândulas supra-adrenais que age como anti-inflamatório natural<sup>4</sup> e, além disso, o efeito benéfico do laser como um anti-inflamatório está ligado a uma adrenal intacta e a resposta não teria lugar na ausência de corticosteróides endógenos<sup>6</sup>. Este trabalho experimental tem por objetivo elucidar esta hipótese investigando a participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a ação do laser de baixa potência sobre as diferentes populações de leucócitos, em especial sobre as células T CD8 e CD45, presentes na inflamação aguda.

### **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos de manipulação animal adotados neste trabalho foram realizados de acordo com as normas e diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, aprovados através do parecer número 016/2009 (Anexo 1).

#### **3.2.1 Animais**

Quarenta e oito ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas, foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a água e dieta balanceada. Estes animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais contendo vinte e quatro ratos cada. Em cada grupo, uma nova divisão aleatória foi realizada, resultando em quatro subgrupos compostos de seis animais.

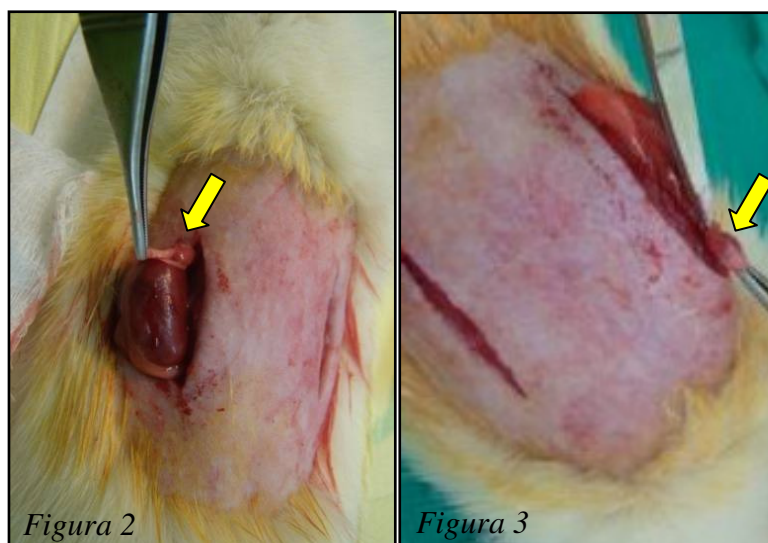
### 3.2.2 Procedimentos cirúrgicos

Sob anestesia com solução anestésica resultante da associação de quetamina 5% (2,5 ml) (Vetanarcol – Konig – lote 007 07, val. mai/2010) e xilazina 2% (0,5 ml) (Sedomin – Konig – lote 002 08, val. jun/2011) diluídas em solução salina (1,0 ml) na proporção de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso dos animais por via intra peritoneal, foi realizada tricotomia no dorso dos ratos e, em condições anti-sépticas duas incisões paralelas medindo 3 cm cada, na região de dorso inferior para acesso aos rins (Figura 1).



*Figura 1. Incisões paralelas no dorso do animal*

Os tecidos subcutâneo e muscular foram divulgacionados e as glândulas adrenais localizadas. De acordo com os grupos experimentais, as glândulas adrenais foram removidas ou preservadas (Figuras 2 e 3).

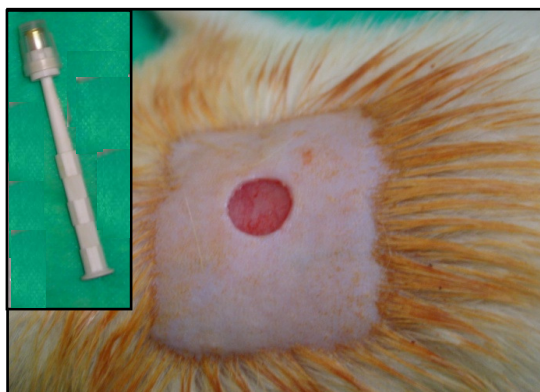


*Figuras 2 e 3. Localização e excisão da glândula adrenal (setas)*

Após 3 dias da primeira intervenção cirúrgica, sob anestesia intra peritoneal cuja solução foi



descrita anteriormente, realizou-se uma ferida circular no tecido cutâneo na região do dorso entre as patas dianteiras do animal e próxima à região cervical (Figura 4). Como instrumento cirúrgico para a padronização desta ferida, foi usado um *punch* (Stiefel Tabe, São Paulo, Brasil) de 6 mm de diâmetro. O *punch* foi encostado perpendicularmente ao tecido previamente tricotomizado e movimentos circulares foram realizados para facilitar a penetração do instrumento, não ultrapassando a profundidade de 1 mm.



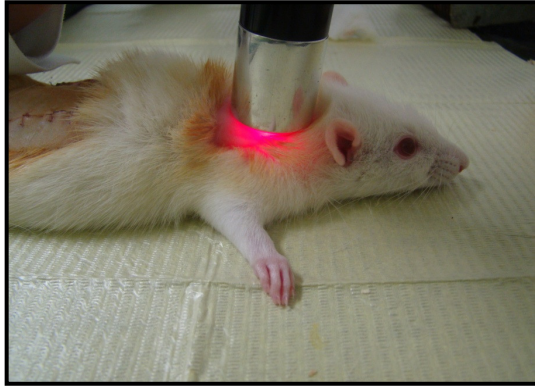
*Figura 4. Ferida circular e punch*

### 3.2.3 Grupos experimentais

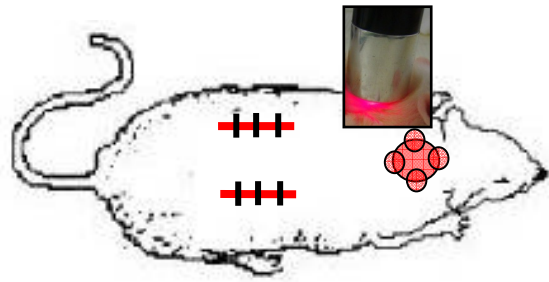
**Grupo I** – *Animais não adrenalectomizados*. Os animais deste grupo foram submetidos à primeira intervenção cirúrgica para localização das glândulas supra-adrenais, porém com preservação das mesmas, e posteriormente submetidos ao procedimento cirúrgico para realização da ferida circular. Este grupo experimental foi constituído por dois subgrupos de doze animais, sendo que seis animais de cada subgrupo foram mortos 24 e 72 horas após a cirurgia.

**Subgrupo 1**. *Controle*. Os animais foram submetidos ao contato da ponteira laser, desligada, sobre a ferida a fim de simular o mesmo estresse dos animais do grupo laser.

**Subgrupo 2**. *Laser*. O aparelho utilizado foi um diodo semiconductor de AsGaAl, emissão contínua (9mW, 670nm, 0,031W/cm<sup>2</sup>) área de saída do raio de 0,28cm<sup>2</sup>, Laser VR-KC-610 – Dentoflex, Brasil. Os animais foram mortos 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea. Para os animais mortos com 24 horas foi aplicado, em contato com ferida, o laser descrito acima numa dose total de 4 J/cm<sup>2</sup> em 4 aplicações pontuais de 1 J/cm<sup>2</sup> imediatamente após a realização da ferida cutânea (4J/cm<sup>2</sup>, 124 segundos) (Figuras 5 e 6). Para os animais mortos com 72 horas o laser descrito acima foi aplicado numa dose total de 8 J/cm<sup>2</sup> em 8 aplicações pontuais, imediatamente após realização de ferida cutânea, e em 48 horas pós-operatórias (4J/cm<sup>2</sup>, 124 segundos) perfazendo um tempo total de 248 segundos.



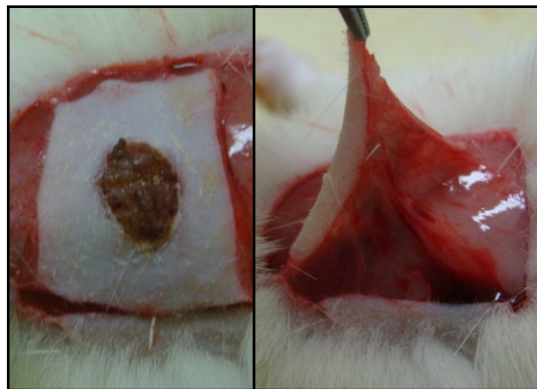
*Figura 5. Aplicação do laser AsGaAl*



*Figura 6. Aplicações pontuais do laser*

**Grupo II** – *Animais adrenalectomizados*. Os animais deste grupo foram submetidos à intervenção cirúrgica para remoção da glândula adrenal de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (The Laboratory Rat, 2000). A ferida circular padronizada, no dorso do rato foi realizada após 3 dias, seguindo o mesmo padrão do Grupo I. Este grupo experimental foi constituído por dois subgrupos de doze animais mortos com 24 e 72 horas após a cirurgia obedecendo às mesmas especificações descritas nos subgrupos 1 e 2 do Grupo I referente aos animais não adrenalectomizados.

Após a morte dos animais foi removida uma porção de tecido cutâneo e muscular subcutâneo em torno da lesão, a qual foi fixada (Figura 7).



*Figura 7. Remoção de tecido cutâneo*

### 3.2.4 Processamento histológico e técnica imuno-histoquímica

Os fragmentos de pele, incluindo a margem da lesão e tecido subcutâneo, foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Secções de 5 micrômetros de espessura foram corados com hematoxilina e eosina e picrossírius, para identificação da matriz de colágeno.

Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizadas lâminas tratadas previamente com solução de organo-silano (A 3648 - Sigma). As secções teciduais foram obtidas a partir de blocos de parafina contendo tecido cutâneo.

Procedeu-se a desparafinização dos cortes histológicos, submetendo as lâminas em três banhos com xilol, dez minutos cada. Em seguida, as mesmas foram desidratadas em soluções de álcool absoluto em dois banhos de cinco minutos cada e lavadas em água corrente e destilada. Para as lâminas marcadas com os anticorpos anti-CD45, anti-CD8 a recuperação antigênica foi realizada com solução de Tampão Citrato, pH 6,0, em banho-maria aproximadamente a 97,6°C por 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas resfriaram em temperatura ambiente e foram banhadas em água destilada.

Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através do reagente Peroxidase Blocking Reagent Ready-to-Use (DAKO, Dinamarca – S2001), em temperatura ambiente. Após essa etapa, realizou-se nova lavagem com água destilada, seguida de três lavagens com PBS pH 7,4. A inibição das ligações inespecíficas foi feita com solução de leite desnatado a 10% em PBS por 20 minutos.

Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários monoclonais anti-CD45 (1:10, PHARMINGEN) para marcação de granulócitos, macrófagos, linfócitos e monócitos e, anti-CD8 (1:10, BIOSOURCE INTERNATIONAL) para marcação de linfócitos T preparados na diluição preconizada através de um diluente com agente redutor de *background* (DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dinamarca, S3022). Os referidos anticorpos foram incubados *overnight* a 4 graus, em câmara úmida.

Após a incubação e equilibrar as lâminas à temperatura ambiente por trinta minutos, realizaram-se três lavagens com PBS de quatro minutos cada e secagem ao redor dos cortes com papel absorvente.

Em seguida, aplicou-se o polímero com HRP do Kit EnVision (DAKO, Dinamarca, K4061) por trinta minutos à temperatura ambiente. Após esse período as lâminas foram lavadas com água destilada e banhadas três vezes com PBS por quatro minutos cada.

A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina (Liquid DAB Substrate Chromogen System, DAKO, Dinamarca, K3466). Posteriormente, após a revelação, as mesmas foram lavadas com água com o objetivo de bloquear a reação. As lâminas foram, então, contra-coradas rapidamente com hematoxilina de Harris, lavadas com água corrente, e depois com água destilada. Por fim, os cortes foram desidratados duas vezes em soluções de álcool absoluto, diafanizados em dois banhos de xilol e montados em Bálsamo do Canadá.

Como controles positivos foram utilizados tecido de granulação e cortes de linfonodo com

conhecida positividade para linfócitos, macrófagos, monócitos e granulócitos em todas as reações imuno-histoquímicas realizadas. Foi utilizado como controle negativo a substituição do anticorpo primário por PBS com BSA.

### **3.2.5 Análise dos dados**

Para a análise dos cortes histológicos utilizou-se microscópio Motic B5 Professional Series com câmera acoplada e interligada ao programa de computador Motic Image Advance 3.0. Antes de utilizar o programa, a calibração para cada objetiva foi conferida pela imagem padrão, capturada de uma lâmina de calibração fornecida pelo fabricante. As lâminas foram examinadas cuidadosamente selecionando randomicamente quatro áreas de 0,1mm<sup>2</sup>. Em seguida, cada área foi capturada no aumento de 40 x e salva em formato JPEG.

O estudo morfométrico foi realizado nas secções teciduais coradas pelo picrossírius para a análise da área da matriz de colágeno e nas secções submetidas à imuno-histoquímica estimou-se a área de células marcadas com os anticorpos anti-CD45 e anti-CD8.

Após a coleta dos dados foi elaboradas planilhas em Excel e os resultados foram analisados estatisticamente através de teste de Shapiro-Wilk para verificar normalidade e o não-paramétrico Mann-Whitney para determinar as diferenças entre os grupos. O nível de significância estatística considerado foi igual a  $p \leq 0,05$ .

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Expressão de Células CD45, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea**

Nos cortes histológicos submetidos à imuno-histoquímica para visualização de células CD45 positivas, observou-se marcação citoplasmática e de aspecto granuloso durante a evolução do processo inflamatório agudo em todos os grupos estudados. Nos animais com a glândula adrenal preservada verificou-se nos dois períodos avaliados, discreto aumento das células CD45 positivas nos tecidos submetidos à terapia luminosa, porém sem significância estatística. Nos animais com a glândula adrenal removida notou-se no período de 24 horas após o procedimento cirúrgico no grupo laser, um menor contingente de células CD45 positivas em relação ao grupo controle, com diferença estatística ( $p=0,004$ ). Observou-se ainda no decorrer dos períodos estudados aumento significativo destas células nos animais submetidos à biomodulação laser ( $p=0,041$ ), (Tabela 1). A ausência da glândula permitiu um aumento das células CD45 em relação ao grupo cuja adrenal foi preservada, com diferença

estatística nos animais controles no período de 24 horas ( $p=0,026$ ), (Tabela 1, Figuras 8 e 9).

**Tabela 1. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células CD45 positivas no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas.**

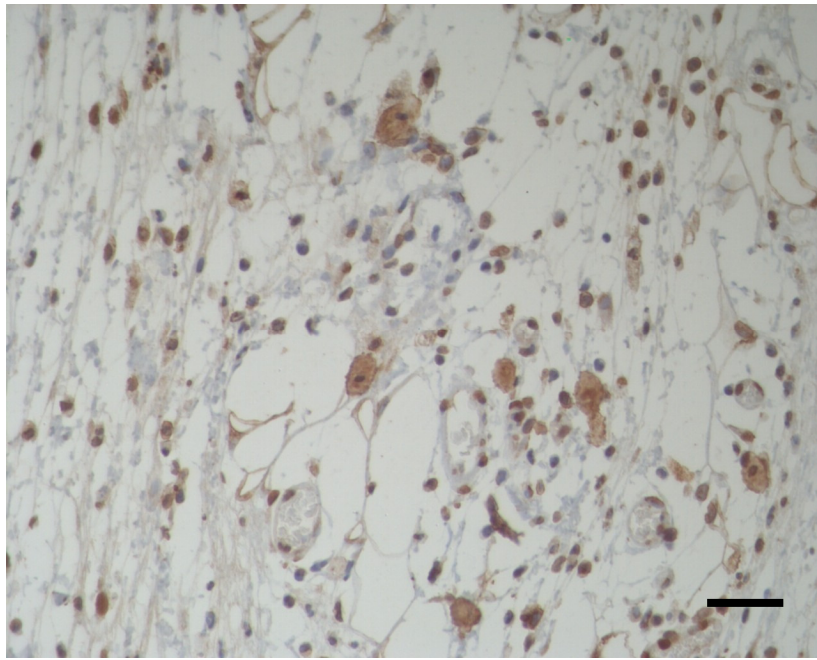
Período de estudo	Células CD45 positivas Mediana ( $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ ) (Q1-Q3)					
	Adrenal Preservada		Adrenal Removida			
	Grupos	$p^{(1)}$	Grupos	$p^{(1)}$		
24 horas	Controle <sup>a</sup>	1,3 (1,1 – 1,9) ** (ae)	0,3	Controle <sup>e</sup>	2,1 (1,9 – 2,5)	0,004*(ef)
	Laser <sup>b</sup>	1,6 (1,4 – 1,7)		Laser <sup>f</sup>	1,7 (1,4 – 1,9) *** (fh)	
72 horas	Controle <sup>c</sup>	1,7 (1,6 – 2,0)	0,9	Controle <sup>g</sup>	2,0 (1,6 – 2,2)	0,8
	Laser <sup>d</sup>	1,9 (1,5 – 2,0)		Laser <sup>h</sup>	2,0 (1,8 – 2,1)	

(1) Teste Exato de Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$

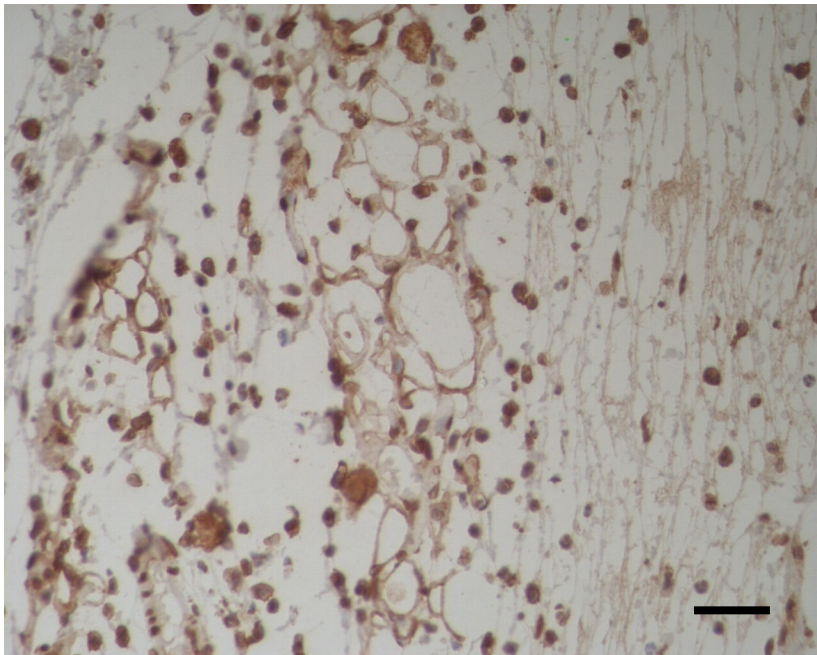
\* (ef): estatisticamente significante entre os grupos laser e controle com adrenal removida em 24 horas ( $p=0,004$ )

\*\* (ae): estatisticamente significante entre os grupos controle com adrenal removida e preservada em 24 horas ( $p=0,026$ )

\*\*\* (fh): estatisticamente significante entre os grupos laser com adrenal removida entre 24 e 72 horas ( $p=0,041$ )



**Figura 8. Células CD45 positivas. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.**



**Figura 9. Células CD45 positivas. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.**

### 3.3.2 Expressão de Células T CD8, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea

A imuno-marcação das células T CD8 foi caracteristicamente citoplasmática. Nos animais com a glândula adrenal preservada verificou-se aumento destas células, com significância estatística 24 horas após o procedimento cirúrgico ( $p=0,04$ ), Figuras 10 e 11. Na ausência da glândula adrenal as diferenças não foram estatisticamente significantes quando os grupos laser e controle foram confrontados. Observou-se nos períodos avaliados diminuição significativa destas células nos animais submetidos à biomodulação laser ( $p=0,002$ ), (Tabela 2). A ausência da glândula permitiu um aumento das células T CD8, com diferença estatística nos animais submetidos à biomodulação laser ( $p=0,041$ ) e nos controles no período de 24 horas ( $p=0,002$ ), Figuras 12 e 13 (Tabela 2).

**Tabela 2. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células T CD8 no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas.**

Período de estudo	Células T CD8 positivas Mediana ( $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ ) (Q1-Q3)				
	Adrenal Preservada		$p^{(1)}$	Adrenal Removida	
	Grupo			Grupo	$p^{(1)}$
24 horas	Controle <sup>a</sup>	1,1 (1,0 – 1,5)	0,04* <sup>(ab)</sup>	Controle <sup>e</sup>	2,3 (2,0 – 2,5) ** <sup>(ae)</sup>
	Laser <sup>b</sup>	1,7 (1,6 – 1,9)		Laser <sup>f</sup>	2,2 (2,1 – 2,4) *** <sup>(bf)</sup>
72 horas	Controle <sup>c</sup>	1,8 (1,7 – 2,0)	0,06	Controle <sup>g</sup>	1,3 (1,0 – 2,0)
	Laser <sup>d</sup>	1,2 (0,9 – 1,7)		Laser <sup>h</sup>	1,4 (1,3 – 1,5) **** <sup>(fh)</sup>

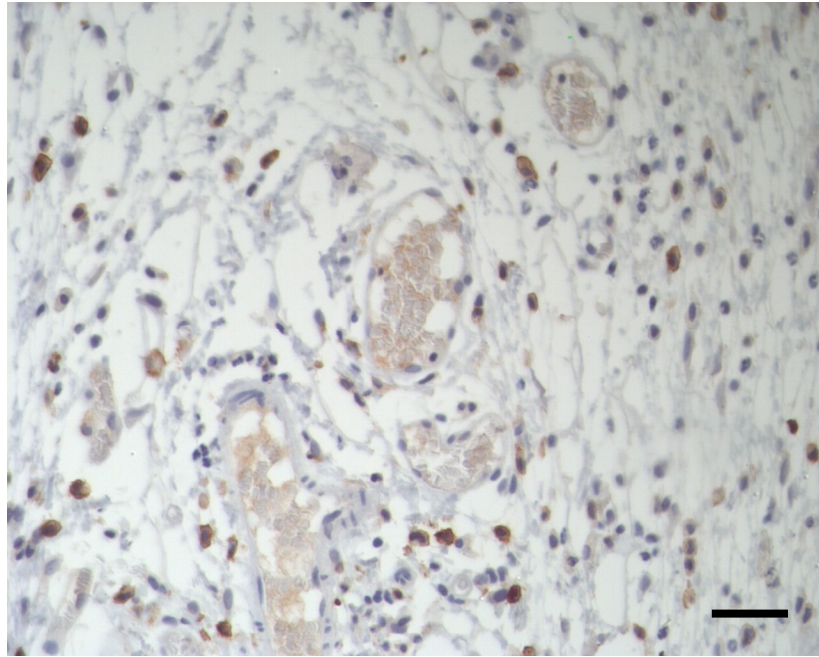
(1) Teste Exato de Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$

\*<sup>(ab)</sup>: estatisticamente significante entre os grupos laser e controle com adrenal preservada em 24 horas ( $p=0,04$ )

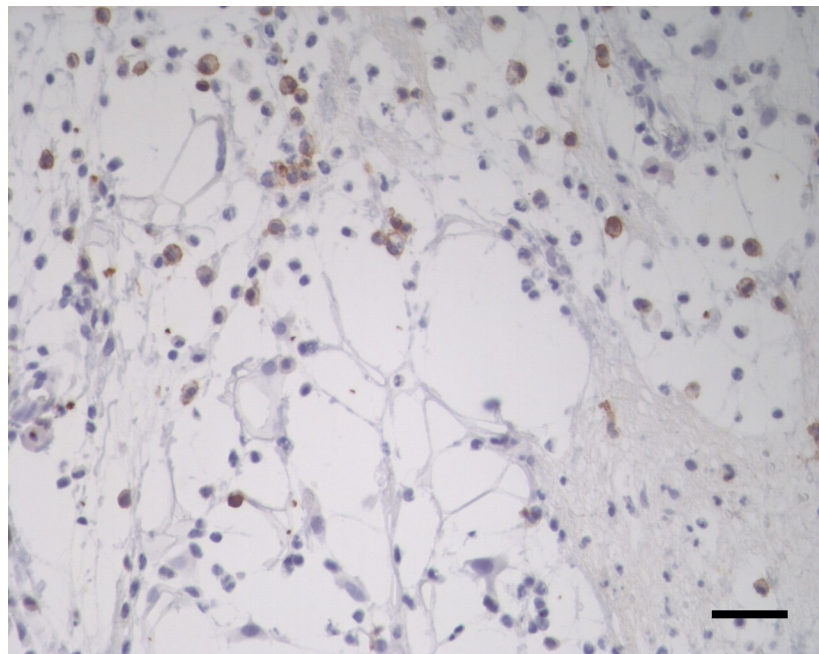
\*\*<sup>(ae)</sup>: estatisticamente significante entre os grupos controle com adrenal removida e preservada em 24 horas ( $p=0,002$ )

\*\*\*<sup>(bf)</sup>: estatisticamente significante entre os grupos laser com adrenal removida e preservada em 24 horas ( $p=0,041$ )

\*\*\*\*<sup>(fh)</sup>: estatisticamente significante entre os grupos laser com adrenal removida entre 24 e 72 horas ( $p=0,002$ )

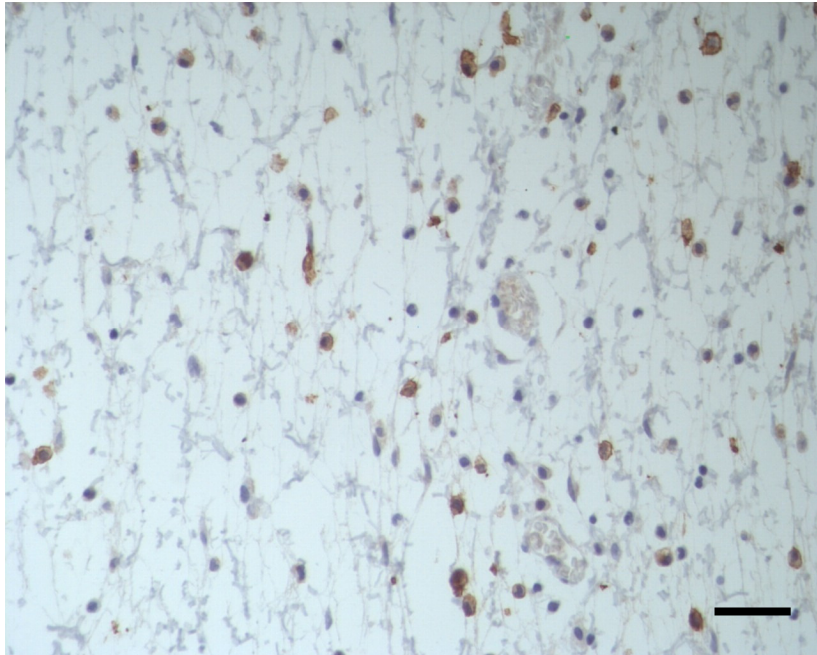


**Figura 10. Linfócitos T CD8. Grupo controle, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm.**

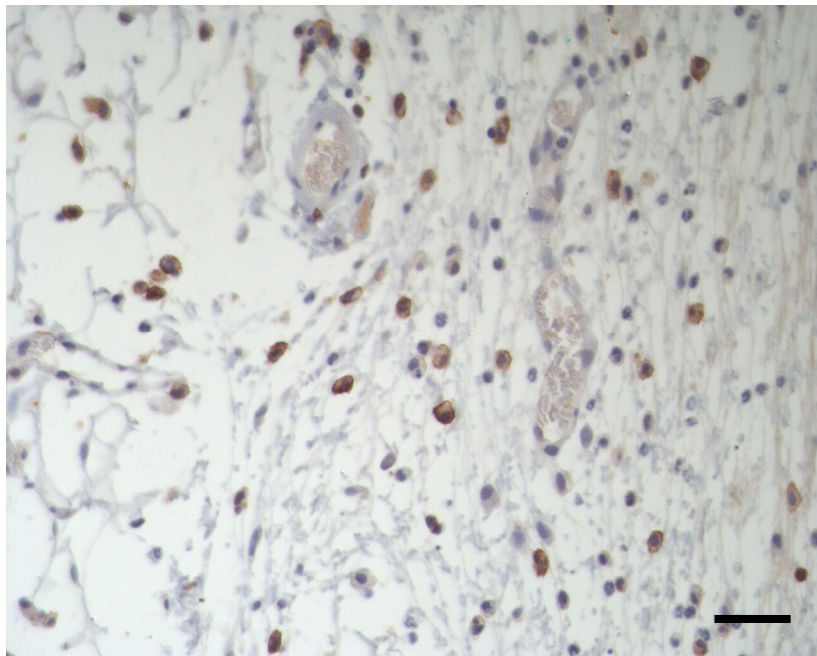


**Figura 11. Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50µm.**





**Figura 12.** Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.



**Figura 13.** Linfócitos T CD8. Grupo laser, 24 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.

### 3.3.3 Expressão de Células T CD8 e CD45, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea

Avaliou-se a expressão de todas as células marcadas com os anticorpos anti-CD45 e anti-CD8. Nos animais com a glândula adrenal preservada, as diferenças foram estatisticamente significativas apenas em relação aos grupos controle nos diferentes períodos ( $p=0,004$ ). Quando a glândula foi removida observou-se menor expressão das células inflamatórias anti-CD45 e anti-CD8 em 24 horas, com diferença estatística entre os grupos controle e laser ( $p=0,02$ ). A ausência da glândula adrenal permitiu um aumento significativo destas células inflamatórias nos animais controle no período de 24 horas ( $p=0,002$ ).

**Tabela 3. Distribuição da expressão imuno-histoquímica de células T CD8 e CD45 no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas.**

Período de estudo	Células T CD8 e CD45 positivas			
	Adrenal Preservada		Adrenal Removida	
	Grupos	$p^{(1)}$	Grupos	$p^{(1)}$
24 horas	Controle <sup>a</sup>	2,8 (2,3 – 3,1) *** (ac)	Controle <sup>e</sup>	4,5 (4,1 – 4,7) ** (ae)
	Laser <sup>b</sup>	3,4 (3,0 – 3,8)	Laser <sup>f</sup>	4,0 (3,6 – 4,1)
72 horas	Controle <sup>c</sup>	3,7 (3,4 – 3,9)	Controle <sup>g</sup>	3,2 (2,8 – 4,3)
	Laser <sup>d</sup>	3,2 (2,4 – 3,8)	Laser <sup>h</sup>	3,4 (3,1 – 3,6)

(1) Teste Exato de Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$

\* (ef): estatisticamente significante entre os grupos laser e controle com adrenal removida em 24 horas ( $p=0,02$ )

\*\* (ae): estatisticamente significante entre os grupos controle com adrenal removida e preservada em 24 horas ( $p=0,002$ )

\*\*\* (ac): estatisticamente significante entre os grupos controle com adrenal preservada entre 24 e 72 horas ( $p=0,004$ )

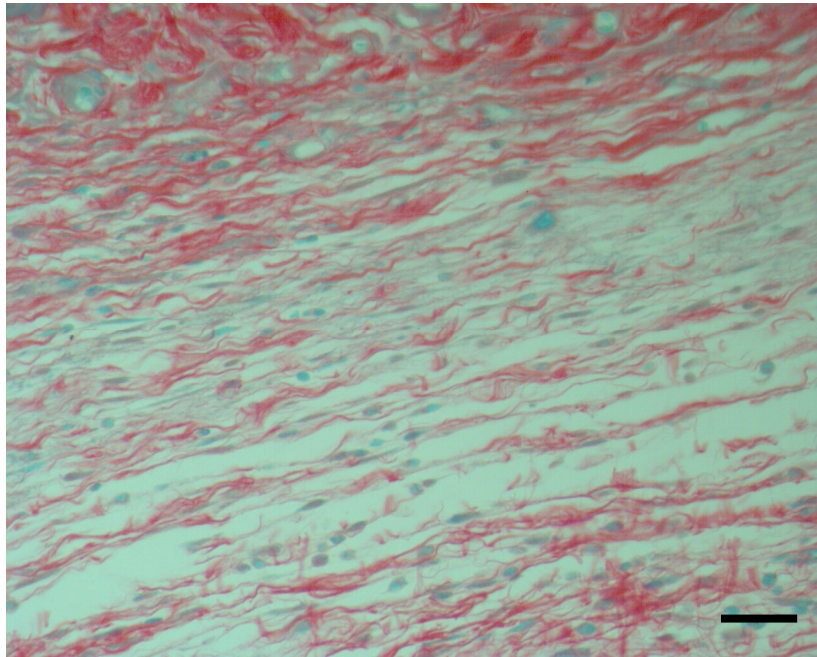
### 3.3.4 Expressão da matriz colagênica, 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea

A expressão do colágeno nos cortes corados pelo Sírius vermelho nos dois períodos avaliados não mostrou significância estatística, na presença e na ausência da adrenal, (Tabela 4, Figuras 14 e 15).

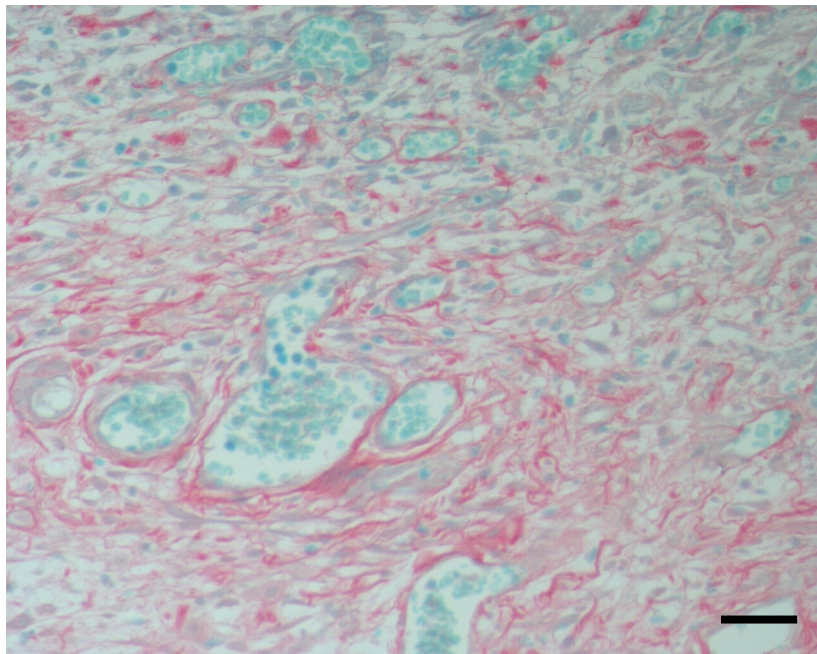
**Tabela 4. Distribuição da expressão da matriz de colágeno no grupo controle e no grupo tratado com laser em animais com adrenal preservada e em animais com adrenal removida nos períodos de 24 e 72 horas.**

Período de estudo	Colágeno					
	Mediana ( $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ ) (Q1-Q3)					
	Adrenal Preservada			Adrenal Removida		
	Grupos	$p^{(1)}$	Grupos	$p^{(1)}$		
24 horas	Controle	1,6 (1,2 – 1,8)	0,18	Controle	1,6 (1,2 – 1,8)	1,00
	Laser	1,3 (0,8 – 1,5)		Laser	1,6 (0,9 – 1,8)	
72 horas	Controle	1,7 (1,1 – 2,0)	0,48	Controle	2,3 (1,4 – 2,5)	0,06
	Laser	1,7 (1,4 – 2,2)		Laser	1,2 (0,9 – 1,7)	

(1) Teste Exato de Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$



**Figura 14.** Expressão da matriz de colágeno com presença de fibras organizadas e paralelas entre si. Grupo laser, 72 horas com glândula adrenal preservada. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.



**Figura 15.** Expressão da matriz colagênica. Não se observa o padrão organizacional do colágeno encontrado na presença da glândula adrenal. Grupo laser, 72 horas com glândula adrenal removida. EnVision. Escala = 50 $\mu$ m.

### 3.4 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é uma seqüência de regulação intrínseca de eventos celulares e moleculares orquestrados no intuito de restaurar a integridade tecidual depois da agressão. O sistema imune, humoral e celular, tem um papel importante no sucesso do processo cicatricial. O pilar celular mais importante é o infiltrado leucocitário que consiste primeiramente de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Estas populações celulares aparecem e agem nas feridas num intervalo específico de tempo e suas migrações caracterizam os diferentes estágios da cicatrização de feridas<sup>7,8</sup>.

Este estudo teve o objetivo de verificar algumas populações celulares essenciais na inflamação aguda, primeiro momento do reparo tecidual, num período de tempo de 24 e 72 horas. Foi estudada a expressão das células CD45 e CD8 positivas. Na família CD45, antígeno comum de leucócitos, há cinco proteínas que encontram-se na superfície das células hematolinfóides e sua imuno-histoquímica expressa linfócitos T, linfócitos B, granulócitos, monócitos e macrófagos. Já o CD8 é um co-receptor para MHC classe I e expressa células T supressoras e citotóxicas.

Concomitantemente à ação das células do processo inflamatório, hormônios esteróides são liberados influenciando a resposta inflamatória, produzidos pelo córtex das glândulas supra-renais<sup>9,10</sup>. Estes hormônios são essenciais para a sobrevivência do indivíduo e participam do mecanismo de estresse adaptativo como um potente agente imuno-supressor<sup>11-13</sup>. Os glicocorticóides interferem na capacidade dos macrófagos em induzir e ampliar uma resposta imune como também inibindo as funções inflamatórias<sup>13</sup>. O sistema imune e neuroendócrino estão interligados como um mecanismo de regulação recíproca. O curso da inflamação é modulado por um aumento na concentração de glicocorticóides no plasma<sup>10,14</sup>. O laser é um modulador efetivo da resposta inflamatória capaz de induzir atividade de células imunes, sendo dependente da dose e da fase flogística em que é aplicado<sup>15</sup>.

Segundo Albertini<sup>6</sup> *et al.* 2004 os efeitos anti-inflamatórios do laser de baixa potência estão relacionados a liberação de hormônios corticosteroides através de glândulas adrenais intactas e a ausência destas glândulas não inibiria a migração de células inflamatórias para o leito da ferida. Esta afirmação foi testada nesta pesquisa ao estudarmos a ação do laser 670 nm em animais com adrenais preservadas e removidas. Observou-se, no entanto, nos animais adrenalectomizados submetidos à biomodulação laser, diminuição na expressão total de células inflamatórias CD8 e CD45 com significância estatística no período de 24 horas entre

controle e laser. Como explicaremos estes resultados?

Revisando a dinâmica normal do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) identifica-se um conjunto de mecanismos neuroreguladores distintos que mediam a secreção do hormônio ACTH como *feedback* negativo por baixa de glicocorticóides<sup>16</sup>. O mecanismo de ação da terapia com laser de baixa intensidade atua na inibição da expressão de moléculas de adesão, na migração de leucócitos e na liberação de mediadores inflamatórios, podendo agir sinergicamente ao eixo HPA, potencializando seu efeito e aumentando a liberação do cortisol endógeno<sup>3</sup>.

A ativação do eixo HPA e a resposta dos glicocorticóides são essenciais para a sobrevivência do indivíduo, como demonstrado pelo fato de que a remoção do eixo HPA, por exemplo, a adrenalectomia ou bloqueio dos receptores de glicocorticóides, aumenta a gravidade da infecção e, em alguns casos aumenta a taxa de mortalidade<sup>11,13</sup>.

Acreditamos que a resposta imune anti-inflamatória encontrada em nosso experimento nos animais adrenalectomizados submetidos ao laser deva-se a presença de tecidos extra-adrenais que sintetizam o cortisol endógeno como, por exemplo, sistema nervoso central<sup>12,17</sup>, tecidos vascular e renal<sup>12</sup>, células intestinais<sup>18</sup> e coração<sup>19</sup> reduzindo a gravidade da agressão e fornecendo proteção contra efeitos letais<sup>20</sup>.

Nesta pesquisa comparou-se também a resposta inflamatória do laser GaAlAs (670nm) dos animais adrenalectomizados àqueles com a adrenal preservada. Verificou-se tanto no grupo controle como no grupo laser aumento da expressão das células T CD8 e CD45, sugerindo que a presença de outros mecanismos que estimulem a liberação de cortisol extra-adrenal, não é suficiente para minimizar a resposta inflamatória.

A perda completa dos hormônios adrenocorticais é incompatível com a vida e leva a desequilíbrios eletrolíticos, dentro de poucos dias a uma semana<sup>11,21</sup>. Sua deficiência, pela adrenalectomia, pode ser considerada um importante fator durante o desenvolvimento da fase aguda inflamatória aumentando a patogênese através do distúrbio do sistema imune do hospedeiro<sup>13</sup>. Neste estudo, os animais sobreviveram ao período do experimento nos grupos submetidos ou não à laserterapia, sem as glândulas supra-adrenais.

Desde Mester<sup>22</sup> *et al.*(1971) numerosos estudos tem sido realizados para investigar os efeitos do laser de baixa potência no reparo tecidual. No entanto, apesar de alguns efeitos fisiológicos benéficos, ainda há fatores não elucidados do seu mecanismo de ação na cicatrização de

feridas. Poucos ensaios clínicos bem conduzidos que confirmam sua eficácia em humanos foram publicados. Há uma variabilidade dos dados, em particular dos parâmetros utilizados, que muitas vezes impede que sejam realizadas comparações entre estudos.

Um dos poucos trabalhos que investiga o efeito desta fototerapia imediatamente após a realização de feridas cirúrgicas refere-se ao estudo de Pereira<sup>23</sup> *et al.* 2010 que observou nos animais irradiados o aumento da resposta inflamatória imediata durante as primeiras horas do experimento, através de níveis mais elevados de células polimorfonucleares, com redução significativa destas células a partir do terceiro dia. Sabe-se que os mastócitos participam ativamente do processo de recrutamento de células imunes através da produção de diversas citocinas contidas nos grânulos citoplasmáticos. As células recrutadas contribuem para a amplificação e progressão do processo inflamatório. Portanto, sugere-se que o aumento da desgranulação mastocitária no grupo irradiado tenha contribuído para o crescimento da infiltração leucocitária. Nossos achados corroboram o estudo supracitado já que nos animais com adrenal preservada observou-se um aumento das células inflamatórias em especial no período de 24 horas, apesar das diferenças serem estatisticamente significantes apenas para as células T CD8.

A dosimetria empregada nos estudos com a terapia laser de baixa potência varia de 2,5 a 30 J/cm<sup>2</sup> <sup>4,5,24-27</sup>. E, em 2003, Medrado<sup>5</sup> *et al.* afirmaram que a dosimetria única de 4 J/cm<sup>2</sup> é suficiente para obter resultados favoráveis na cicatrização de feridas<sup>3,5,26,28</sup>. Nesta pesquisa realizaram-se dosimetrias fracionadas nos dois períodos de experimento. Os animais mortos 24 horas após a realização da ferida cirúrgica receberam apenas uma dose de 4 J/cm<sup>2</sup> enquanto aqueles que foram mortos 72 horas após a cirurgia, foram tratados com uma dose total de 8 J/cm<sup>2</sup>. Verificou-se somente diferenças estatísticas das células inflamatórias nos grupos irradiados com 4 J/cm<sup>2</sup> em relação aos controle, independente da presença ou ausência da adrenal. Já os animais irradiados com 8 J/cm<sup>2</sup> não mostraram diferenças na expressão das células CD45 e T CD8 em ambos os grupos com e sem adrenais.

O estudo do colágeno tem sido descrito na literatura em modelos *in vitro* e *in vivo* com diferentes dosimetrias e em sua maioria percebe-se um efeito estimulador da síntese desta proteína sob a ação do laser de baixa potência. Talvez a maior contribuição na esfera desta fototerapia em relação à síntese da matriz extracelular se refira ao seu efeito qualitativo. Em estudo ultraestrutural sobre a cronologia do reparo de feridas cutâneas de ratos tratados com o laser GaAlAs utilizando os mesmo parâmetros descritos em nossa pesquisa, a saber, 9mW e

670 nm, observaram-se fibroblastos mais numerosos com o aparato de síntese mais desenvolvido em relação ao grupo controle. Estas células estavam distribuídas entre feixes de fibras colágenas organizadas e paralelas. Sob luz polarizada, verificou-se uma melhor conformação estrutural do colágeno que refletiu uma maior interação das células secretoras com esta proteína e também outras moléculas da matriz extracelular<sup>2</sup>. Apesar dos resultados quantitativos do presente estudo não evidenciarem diferenças estatísticas em relação ao colágeno, observou-se melhor distribuição desta proteína nos grupos tratados com laser, independente da ausência ou presença da adrenal.

Assim, verificamos nesta pesquisa que a ação do laser 670 nm não depende exclusivamente da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e conseqüentemente da liberação de corticosterona endógena secretada pelas glândulas adrenais. Acredita-se que enzimas corticosterogênicas liberadas em tecidos extra-adrenais possam modular a resposta imune sob a ação desta fototerapia.

### **3.5 CONCLUSÕES**

Diante da metodologia empregada e dos resultados encontrados pode-se concluir que a biomodulação laser modificou a expressão de células T CD8 e CD45 durante a inflamação aguda após a realização de feridas cutâneas em ratos. A ação do laser não depende exclusivamente da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

### **3.6 ABSTRACT**

[Aims] To analyze the acute inflammatory process and the influence of the HPA axis in healing of cutaneous wounds undergoing biomodulation laser. [Methods] Forty eight rats were divided into 2 groups, adrenalectomized (GI) and non-adrenalectomized with 24 rats each with two subgroups, irradiated and control of 12 animals, and 6 animals from each group were killed 24 and 72 hours after surgery. All animals underwent surgical procedures for localization of the adrenal glands but only the animals of GI had them removed. 3 days after adrenalectomy was performed skin wound. Immunohistochemical analysis with markers anti-CD45 and anti-CD8 was performed with skin tissue. Data were collected and analyzed by the non-parametric Mann Whitney comparisons. [Results] In the animals with the adrenal gland removed there was statistical difference in 24-hour period in the laser group, with a smaller number of total cells and CD45 positive compared with the control group and compared between laser groups in the periods studied for T CD8 cells. Still, when compared the expression of the cells between control groups with adrenal preserved and removed in 24 hours there was statistical differences for both CD45 cells and for CD8 cells and total cells. [Conclusion] The biomodulation laser modifies the expression of CD45 and T CD8 cells during acute inflammation after performed skin wounds in rats. The laser action does not depend solely on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.



**KEY WORDS:** Inflammation, laser, adrenal, CD8, CD45.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JGP, Barros, LAP, Moysés MR. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40:877-84.
2. Reis SRA, Medrado A, Marchionni AM, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670 nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomedicine & Laser Surgery*. 2008;26:305-10.
3. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Jr. JA, Costa MS. Cox-2 mRNA expression decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm. Res.*2007;56:228-229.
4. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes-Martins PSL, Carvalho FAZ, Neto HCCF, Iversen VV, *et al.* Steroid Receptor Antagonist Mifepristone Inhibits the Anti-inflammatory Effects of Photoradiation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006, 24(2): 197-201.
5. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003;32:239-244.
6. Albertini R, Ambiere FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zângaro RA, Lopes-Martins RAB. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2004; 74:101–7.
7. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2004, 187:11S-16S.
8. Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007;127:514-25.
9. Brandt J, Luhder F, McPherson KG, Graaf KL, Tischner D, Wiehr S *et al.* Enhanced Glucocorticoid Receptor Signaling in T Cells Impacts Thymocyte Apoptosis and Adaptive Immune Responses. *AJP March* 2007; 170 (3) 1041-53.
10. Ruzek MC, Pearce BD, Miller AH, Biron CA. Endogenous Glucocorticoids Protect Against Cytokine-Mediated Lethality during Viral Infection. *The Journal of Immunology*. 1999;162:3527-33.
11. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ed. São Paulo:Ed; Elsevier, 2006.
12. Freel EM, Bernhardt M, Ingramt R, Wallace AM, Fraser R, Davies E, *et al.* Endogenous corticosteroids biosynthesis in subject after bilateral adrenalectomy. *Clinical Endocrinology*. 2007;66, 659-665.
13. Guerra-Lopes ES, Caldeira JC, Santos CD, Toldo MPA, Faccioli LH, Sá-Nunes A, *et al.* Trypanosoma cruzi: Effects of adrenalectomy during the acute phase of experimental infection. *Experimental Parasitology*, 2008;120:10-14.
14. Cavalcanti DMH, Lotufo CMC, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SHP. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *British Journal of Pharmacology*. 2007;152:1291-1300.
15. Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Chudnovsky VM, Fesenko EE. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermal Photoimmunol*

- Photomed, 2006;22:33-38.
16. Veldhus JD, Iranmanesh A, Naftolowitz D, Tatham N, Cassidy F, Carroll BJ. Corticotrop Secretory Dynamics in Human under Low Glucocorticoid Feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001;86:5554-63.
  17. Stoffel-Wagner B. Neurosteroids biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann NY Acad Sci*, 2003;1007:64-78.
  18. Cima I, Corazza N, Divk B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med*, 2004;200:1635-46.
  19. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mousas C, Moalic JM, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*, 1998;273:4883-91.
  20. Webster JJ, Sternberg, EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *Journal of Endocrinology* 2004; 181, 207-221.
  21. Tortora GJ, Grabowski SR. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 534-538, 2009.
  22. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*, 1971;122:532-35.
  23. Pereira MCMC, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 98, 2010;188-192
  24. Lucroy MD, Edwards BF, Madewell BR. Low-intensity laser light-induced closure of a chronic wound in a dog. *Veterinary Surgery* 1999; 28: 292-95.
  25. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvascular Research* 2002; 64:240-6.
  26. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *British Journal of Dermatology* 2003; 148:334-6.
  27. Markovic A, Todorovic LJ. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing oedema after third molar surgery: a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2007;36:226-29.
  28. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):307-13.

**ANEXO I**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO  
DE ANIMAIS NO ENSINO E  
PESQUISA (EBMSP)

Salvador, 02 de maio de 2010

O projeto do curso de Odontologia protocolado nesta comissão sob nº 016/2009, intitulado **“Influência do cortisol endógeno na cicatrização de feridas cutâneas submetidas à biomodulação laser”**, sob responsabilidade da pesquisadora Dra Silvia Regina de Almeida Reis foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

  
**Dra. Luciana Lyfa Casais e Silva**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de  
Animais Escola Bahiana de Medicina e Saúde  
Pública (CEUA-EBMSP)