



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM  
ODONTOLOGIA**

**TILA FORTUNA COSTA**

**EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A  
DENSIDADE VASCULAR E A FIBROPLASIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Salvador**

**2016**

**TILA FORTUNA COSTA**

**EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A  
DENSIDADE VASCULAR E A FIBROPLASIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu de Mestrado Profissional em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia com área de concentração em Estomatologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alena Ribeiro Alves  
Peixoto Medrado

Salvador

2016

Ficha Catalográfica elaborada pelo  
Sistema Integrado de Bibliotecas da EBMSP

C383 Costa, Tila Fortuna

Efeito biomodulador do laser de baixa potência sobre a densidade vascular e a fibroplasia. / Tila Fortuna Costa. – Salvador: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. 2016.

55f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Dissertação (mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia

1. Terapia com luz de baixa intensidade. 2. Cicatrização. 3. Colágeno.  
I. Medrado, Alena Ribeiro Alves Peixoto. II. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. III. Título.

CDU: 616.314

Nome: COSTA, Tila Fortuna

Título: Efeito biomodulador do laser de baixa potência sobre a densidade vascular e a fibroplasia

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: 17 de junho de 2016

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Taís Menezes Cerqueira Campos De Britto  
Titulação: Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Bahia  
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira  
Titulação: Doutora em Estomatologia pela FOP-UNICAM  
Instituição: Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr.: Antônio Márcio Teixeira Marchionni  
Titulação: Doutor em Laser pela Universidade Federal da Bahia  
Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

## **INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMS  
Curso de Odontologia  
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB  
Bolsa de Mestrado

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - CPqGM  
Laboratório de Patologia Experimental – LAPEX

Instituto de Ciências da Saúde – ICS  
Laboratório de Bioquímica Oral  
Universidade Federal da Bahia

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre me apoiaram em todas as fases da trajetória de minha vida, meus pais: Celso e Thelma.

Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, **Jesus Cristo**, que permitiu que eu chegasse até aqui. Aquele que tem me sustentado e me maravilhado com suas bênçãos sem medidas.

Aos meus pais, **Celso** e **Thelma**, que me deram absolutamente tudo, amor, educação e que têm me apoiado em minha trajetória.

Às minhas irmãs, **Tiara**, **Taisa** e suas famílias **Lima** e **Tepas**, com quem divido minhas angústias e vitórias.

À **Vockton**, pelo carinho, paciência e compreensão durante esses anos, obrigada por estar presente sempre. Você é mais que especial.

Aos meus amados familiares, em especial à **tia Márcia**, **tia Rei** e avós **Detezinha** e **Naná**, por estarem sempre torcendo por mim e orando comigo pelos mesmos objetivos.

Aos **amigos** de infância, da época da faculdade, da residência e do mestrado, que estiveram dispostos a me ouvir e, em troca, sempre me dar uma palavra de consolo e força, me impulsionando nessa caminhada.

À minha querida orientadora, professora **Alena Medrado**, a qual é mais do que um exemplo de mestre para mim, é um exemplo de pessoa. Obrigada por ter me acolhido novamente, por ter dispendido do precioso tempo com sua família para ler e corrigir cada parte deste trabalho com toda a sua atenção, carinho e competência.

Aos demais mestres que passaram por minha vida, em especial à equipe do mestrado, professores **Luiz Gustavo**, **Andréa**, **Silvia**, **Sandro**, **Érica**, **Emilena**, **Viviane**, **Márcio**, **Lívia**, **Roberta**, **Maria das Graças** e **Urbino**.

Em especial à **Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima**, que muito contribuiu para que eu pudesse dar continuidade às etapas desta pesquisa.

Ao **Dr. Zilton Andrade** que foi extremamente solícito ao abrir as portas do LAPEX para que eu pudesse realizar todas as etapas do experimento.

À querida equipe da FIOCRUZ, **Ana Cristina Gonzalez, Elisângela Trindade** e **Sr. Antônio Santos** por todo o apoio que me deram, o meu “muito obrigada” jamais será suficiente para agradecer a ajuda de vocês.

À professora **Gabriela Botelho Martins** e ao chefe do **Laboratório de Bioquímica Oral** do Instituto de Ciências da Saúde, **Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo** que permitiram que utilizássemos os equipamentos para a obtenção dos dados desta pesquisa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia** por ter me concedido a bolsa que muito ajudou na construção desta pesquisa.



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AsGaAl – Arseneto de gálio e alumínio

ATP – Adenosina trifosfato

bFGF – *Basic Fibroblastic Growth Factor* (Fator de Crescimento Fibroblástico Básico)

CD-31 – *Cluster determinant 31* (Grupamento de diferenciação 31)

CD4 – Linfócitos T CD4 (auxiliares)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm<sup>2</sup> – Centímetro(s) quadrado(s)

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CTGF – *Connective Tissue Growth Factor* (Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo)

DAB – Diaminobenzidina

EGF – *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)

EUA - Estados Unidos da América

FGF-2 - *Fibroblastic Growth Factor 2* (Fator de Crescimento Fibroblástico 2)

HE – Hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HIF-1 $\alpha$  – *Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha* (Fator Indutor de Hipóxia 1 alfa)

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

IL – Interleucina

J/cm<sup>2</sup> – Joule(s) por centímetro quadrado

MMP-2 – Metaloproteinase da matriz 2

$\mu$ m – Micrômetro(s)

mm – Milímetro(s)

mM - MiliMolar

mg/Kg – Miligrama por quilograma

mW – Miliwatt(s)

nm – Nanômetro(s)

pH – Potencial hidrogeniônico

PDGF – *Platelet Derived Growth Factor* (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

PDECGF - *Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor* (Fator de Crescimento de Células Endoteliais Derivado de Plaquetas)

Q1 – *Quartile 1* (Quartil 1)

Q3 – *Quartile 3* (Quartil 3)

TLBP – Terapia com Laser de Baixa Potência

TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta* (Fator de Crescimento Transformador beta)

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)

W/cm<sup>2</sup> – Watt(s) por centímetro quadrado

°C – Graus Celsius

$\lambda$  – Comprimento de onda

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos grupos e respectivos dias de eutanásia.	36
Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados no estudo e suas especificações.	37
Tabela 3 – Expressão quantitativa de colágeno nos diferentes períodos do estudo nos grupos experimentais Controle e Laser.	40
Tabela 4 – Avaliação da expressão de células VEGF+ nos diferentes períodos do estudo nos grupos experimentais Controle e Laser.	41
Tabela 5 – Número de vasos sanguíneos encontrados durante os diferentes períodos do estudo nos grupos experimentais Controle e Laser.	43
Tabela 6 – Correlação da área de colágeno com células VEGF+ e vasos sanguíneos nos grupos experimentais Controle e Laser.	44
Tabela 7 – Correlação entre células VEGF+ e vasos sanguíneos nos grupos experimentais Controle e Laser.	44

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito I

Figura 1 – A) Ilustração de um vaso sanguíneo formado por células endoteliais que compartilham a membrana basal com pericitos (células azuis). B) Após a dissolução da membrana basal, ocorre liberação de metaloproteinases e sinalização para a migração das células endoteliais. C) Migração e proliferação das células endoteliais com formação do arcabouço do novo vaso. D) Broto capilar neoformado com células perivasculares (pericitos), cuja presença indica o processo de maturação do novo vaso. 17

Figura 2 – Eletromicrografia que ilustra fibras colágenas de pele de rato, dispostas em feixes organizados e compactos na matriz extracelular, 10 dias após a indução de um ferimento cirúrgico (Microscopia eletrônica de Transmissão, 4500X). 24

Figura 3 – Secção de pele de rato que evidencia síntese de colágeno 72 horas após a realização de ferimento cutâneo, sem irradiação com laser (A) e com irradiação com laser de baixa potência (B) (Sírius vermelho, 100X). 24

### Manuscrito II

Figura 1 – Área correspondente ao ferimento cutâneo que evidencia a fibroplasia. A) Grupo Controle, 21 dias após ferimento cutâneo. B) Grupo Laser, 21 dias. C) Grupo Controle, 35 dias após ferimento cutâneo. D) Grupo Laser, 35 dias (Hematoxilina-eosina, 400X). 39

Figura 2 – Expressão da matriz colagênica corada em vermelho correspondente ao período de 14 dias (A-B, grupos Controle e Laser respectivamente) e 21 dias (C-D, grupos Controle e Laser respectivamente), após a realização do ferimento cutâneo (Sírius vermelho, 400X). 40

Figura 3 – Expressão de células VEGF+ na área correspondente à fibroplasia. (A) No contorno de pequenos capilares (asteriscos), (B) Como entidades isoladas dispersas na matriz conjuntiva (setas) (C-D) Grupos Controle e Laser, 21 dias, respectivamente (Imunohistoquímica, anti-VEGF, 400X). 42

Figura 4 – Expressão de células CD31+ em capilares sanguíneos na área correspondente à fibroplasia. (A) Grupo Laser, 35 dias, (B-C) grupos Controle e Laser, 21 dias, respectivamente (Imunohistoquímica, anti-CD31, 400X). 43

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>MANUSCRITO I</b> .....	13
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1 A laserterapia e o reparo tecidual</b> .....	19
<b>2.2 Variáveis da TLBP e sua ação no reparo</b> .....	21
<b>2.3 Ação do laser sobre a neoangiogênese e o remodelamento</b> .....	21
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>MANUSCRITO II</b> .....	30
<b>RESUMO</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	32
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	35
<b>2.1 Grupos experimentais</b> .....	35
<b>2.2 Histologia</b> .....	36
<b>2.3 Imuno-histoquímica</b> .....	36
<b>2.4 Histomorfometria</b> .....	37
<b>2.5 Análise estatística</b> .....	38
<b>3 RESULTADOS</b> .....	39
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>ANEXO</b> .....	55

## INTRODUÇÃO GERAL

O processo de reparo tecidual é uma resposta fisiológica às lesões, que geralmente resulta na restauração total ou parcial da morfologia e da função do tecido (Sawasaki *et al.*, 2009). Consiste em 4 fases bem definidas e que, na maioria das vezes, ocorrem concomitantemente: hemostasia, fases inflamatórias exsudativa e proliferativa, e aquela correspondente ao remodelamento tecidual (Guo & Dipietro, 2010). Durante a fase proliferativa da cicatrização, a microvasculatura da ferida também é construída de forma a reestabelecer o fornecimento de nutrientes para a regeneração do tecido, promover a fibroplasia e prevenir a hipóxia tecidual (Greaves *et al.*, 2013).

A terapia com laser de baixa potência acelera o reparo, pois proporciona redução do edema e uma rápida transição do contingente de células inflamatórias polimorfonucleares para o infiltrado monomorfonuclear, associada ao aumento da síntese de fibras colágenas e incremento do padrão de organização dos componentes fibrilares da matriz extracelular (Reis *et al.*, 2008).

Dentre os diversos benefícios promovidos pela laserterapia encontram-se o estímulo à biossíntese de integrantes da matriz extracelular, mitose de diversos tipos celulares e neoangiogênese (Maier *et al.*, 1990; Chaves *et al.*, 2014; Loreti *et al.*, 2015).

Apesar da existência de muitos estudos que abordaram as ações primárias da terapia com laser de baixa potência na cicatrização de ferimentos, ainda não está esclarecido na literatura até que ponto a ação do laser nas primeiras fases da cicatrização poderia se perpetuar durante o reparo tardio. Em especial, na etapa de remodelamento da matriz extracelular. Torna-se relevante, portanto, considerar a atuação da terapia laser de baixa potência sobre o processo de neoangiogênese, o qual tem continuidade no desenrolar do remodelamento tecidual.

**MANUSCRITO I****COMO O LASER DE BAIXA POTÊNCIA INTERFERE NA  
NEOANGIOGÊNESE E NO REMODELAMENTO TECIDUAL? UMA  
REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA*****HOW DOES LOW LEVEL LASER THERAPY AFFECT NEOANGIOGENESIS AND  
TISSUE REMODELING OF WOUND HEALING? A NARRATIVE LITERATURE  
REVIEW***

Tila Fortuna<sup>1</sup>, Ana Cristina Gonzalez <sup>2</sup>, Máira Ferreira Sá<sup>3</sup>, Sílvia R. A. Reis<sup>4</sup>, Alena  
R. A. P. Medrado<sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Mestranda em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>2</sup> Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>3</sup> Cirurgiã-dentista pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>4</sup> Professora adjunto do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

## RESUMO

Ao longo dos últimos anos, a bioestimulação celular induzida pela laserterapia tem sido muito estudada. Entre alguns dos processos estimulados pelo laser de baixa potência procedem o ciclo celular, a modulação fenotípica e alterações vasculares como, vasodilatação e neoangiogênese. O aumento do número de novos vasos sanguíneos, acelera a evolução do processo inflamatório e favorece a cicatrização da ferida. A neoangiogênese é ainda um componente estrutural importante de reparação tecidual, uma vez que esta sempre precede a síntese e a deposição de colágeno. A fotobiomodulação estimula também a proliferação fibroblástica e a biossíntese de fibras colágenas. O objetivo da presente revisão narrativa da literatura foi descrever os efeitos da terapia com laser de baixa potência sobre a neoangiogênese e a fibroplasia, assim como de que maneira estes processos ocorrem no tecido submetido à uma agressão. Observou-se que, embora a ação do laser de baixa potência sobre os processos que se desenrolam nas etapas iniciais do reparo tecidual esteja bem documentada na literatura, novos estudos que contemplem a sua influência na fase tardia da cicatrização podem ser relevantes para determinar por quanto tempo os efeitos benéficos primários oriundos da utilização desta modalidade terapêutica, podem se perpetuar no tecido em formação.

Palavras-chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Cicatrização. Matriz extracelular. Colágeno.



## ABSTRACT

Over the past few years, cellular biostimulation induced by laser therapy has been widely studied. Among some of the processes stimulated by low-level laser include cell cycle, phenotypic modulation and vascular changes as vasodilation and neoangiogenesis. The increased number of new blood vessels accelerate the development of inflammation and promotes healing of the wound. Neoangiogenesis is still an important structural component of tissue repair, since it always precedes synthesis and deposition of collagen. The photobiomodulation also stimulates fibroblast proliferation and biosynthesis of collagen fibers. This review of the literature aims to describe the effects of low-level laser therapy on neoangiogenesis and fibroplasia, as well as how these processes occur in the injured tissue. Though the action of low-level laser on the processes that take place in the early stages of tissue repair are well documented in the literature, further studies that address its influence in the late phase of healing may be relevant to determine how long primary benefits of this therapy can be perpetuated in tissue formation.

Keywords: Low-level Light Therapy. Wound healing. Extracellular matrix. Collagen.

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de reparo tecidual é uma resposta fisiológica às lesões, que geralmente resulta na restauração total ou parcial da morfologia e da função do tecido. A cicatrização inicia-se com a hemostasia e a inflamação aguda. A fase inflamatória aguda é caracterizada essencialmente por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Estes eventos são desencadeados por potentes mediadores químicos pré-formados em grânulos secretórios tais como a histamina, que é uma amina vasoativa liberada pelos mastócitos<sup>(1)</sup>.

Durante a fase proliferativa da inflamação, a microvasculatura das feridas é reconstruída, a fim de restabelecer o fornecimento de nutrientes para o tecido em formação e prevenir a hipóxia neste<sup>(2)</sup>. O aumento do número de novos vasos sanguíneos, acelera a evolução do processo inflamatório e favorece a cicatrização da ferida. A não ocorrência deste relevante fenômeno biológico irá resultar em cicatrização retardada e/ou deficiente biossíntese dos elementos que integrarão a nova matriz extracelular<sup>(2,3)</sup>.

A dinâmica vascular é um processo altamente orquestrado. As células endoteliais, produzem enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular. Em consequência, há migração celular e formação de novos brotos vasculares. A neoangiogênese se estabelece pela ação concomitante de fatores de crescimento e de inibição. Várias vias de transdução de sinais complexos participam da regulação deste processo (Figura 1)<sup>(4)</sup>.

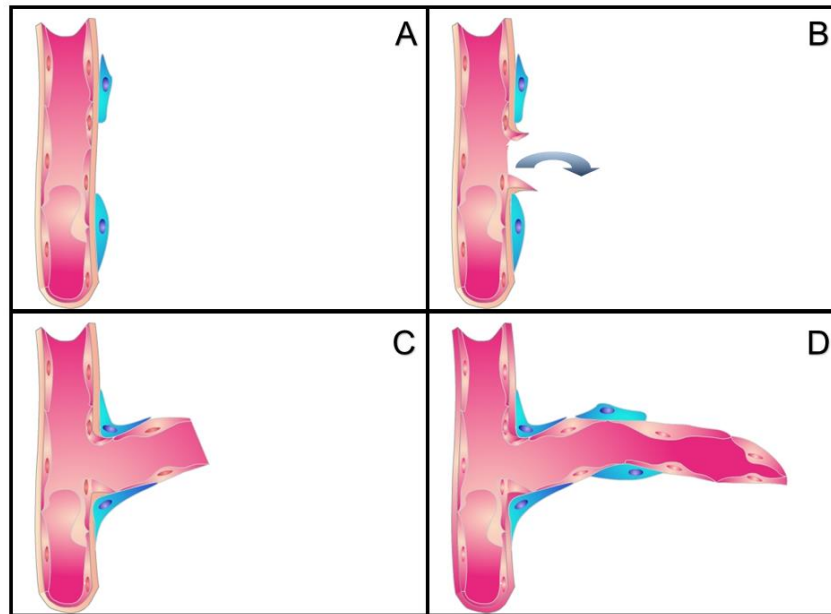


Figura 1 – A) Ilustração de um vaso sanguíneo formado por células endoteliais que compartilham a membrana basal com pericitos (células azuis). B) Após a dissolução da membrana basal, ocorre liberação de metaloproteinases e sinalização para a migração das células endoteliais. C) Migração e proliferação das células endoteliais com formação do arcabouço do novo vaso. D) Broto capilar neoformado com células perivasculares (pericitos), cuja presença indica o processo de maturação do novo vaso.

Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2010<sup>(5)</sup>.

Nas fases mais tardias do reparo tecidual, há formação do tecido de granulação, o qual se torna progressivamente menos vascularizado. Este tecido, que pode ter seu início deflagrado a partir do 3º dia a contar do estabelecimento da lesão, representa uma matriz provisória sobre a qual se formará a matriz extracelular definitiva, futura. Ocorre deposição progressiva de fibras conjuntivas e o tecido fibroso cicatricial exhibe gradativamente um maior grau de compactação destas e por fim, "amadurece" com o tempo<sup>(6)</sup>.

Os efeitos da angiogênese e fatores pró-angiogênicos, incluindo a ação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) na fibroplasia, remodelamento da matriz extracelular e fase final da formação do tecido conjuntivo cicatricial têm sido extensivamente estudados, e, ao, que parece, podem se estender até períodos de tempo mais avançados no tecido, mesmo na ausência de evidências clínicas da

lesão inicial<sup>(7)</sup>. De fato, em um estudo experimental que avaliou a regressão da lesão granulomatosa realizado por Andrade *et al.* <sup>(8)</sup>, demonstrou-se que o remodelamento vascular e tecidual pode se perpetuar por um período de tempo relativamente longo após o estabelecimento de uma lesão.

Embora haja um considerável número de estudos sobre as ações biológicas induzidas pela terapia com laser de baixa potência (TLBP) nas fases iniciais do reparo tecidual<sup>(9,10)</sup>, os seus efeitos sobre a matriz extracelular na fase tardia da cicatrização têm sido pouco explorados na literatura. Os efeitos benéficos do laser de baixa potência exercem um impacto decisivo nas alterações primárias observadas no tecido lesionado a exemplo de vasodilatação, estímulo à migração de células inflamatórias e incremento da drenagem linfática<sup>(10,11)</sup>. No âmbito dos processos proliferativos, alguns autores têm relatado aumento expressivo da neoangiogênese, proliferação fibroblástica e biossíntese de colágeno<sup>(12,13)</sup>. Mas, até quando se estenderiam estas ações benéficas primárias descritas, considerando-se todo o período cicatricial de um determinado tecido? Embora a resposta a este questionamento possa variar de acordo com o tecido em questão, este aspecto ainda precisa ser melhor avaliado através da realização de novos ensaios clínicos e estudos experimentais.

Frente às evidências relatadas na literatura, as quais destacam a relevância da neoangiogênese para o remodelamento tecidual e a participação do laser neste processo, o objetivo do presente trabalho é documentar os efeitos da terapia com laser de baixa potência sobre a neoangiogênese e a fibroplasia, bem como descrever de que maneira estes processos ocorrem no tecido submetido à uma agressão. Na primeira parte da revisão, serão discutidos os efeitos da laserterapia sobre o conjunto de fenômenos biológicos que regem o reparo, e na segunda parte será enfatizada a sua ação sobre a neoangiogênese e o remodelamento da matriz extracelular.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A laserterapia e o reparo tecidual

O reparo tecidual consiste em 4 fases bem definidas e que, na maioria das vezes, ocorrem concomitantemente: hemostasia, fases inflamatórias exsudativa e proliferativa, e aquela correspondente ao remodelamento tecidual<sup>(14)</sup>. Os efeitos fotobiológicos da radiação laser sobre o reparo tecidual, convencionalmente, podem ser classificados em efeitos a curto e longo prazo. As respostas a curto prazo são aquelas nas quais o efeito pode ser observado poucos segundos ou minutos após a irradiação. Já os efeitos observados a longo prazo são aqueles que ocorrem horas ou ainda dias após o final da utilização do laser e, usualmente, envolvem nova biossíntese celular. Estes efeitos podem ser visualizados especialmente na fase proliferativa do reparo<sup>(15)</sup>.

Há relatos na literatura que indicam que a terapia com laser de baixa potência, quando aplicada sobre feridas cutâneas, é capaz de promover a modulação da inflamação, neoangiogênese, proliferação epitelial e de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração do ferimento. A pele representa um excelente tecido para o estudo da laserterapia sobre a cicatrização, na qual todos os fenômenos biológicos supracitados podem ser visualizados<sup>(3,10,11,13,15-17)</sup>.

A TLBP acelera o reparo, pois proporciona redução do edema e uma rápida transição do contingente de células inflamatórias polimorfonucleares para o infiltrado monomorfonuclear, associada ao aumento da síntese de fibras colágenas e incremento do padrão de organização dos componentes fibrilares da matriz extracelular<sup>(10)</sup>. Por exemplo, em um estudo que avaliou os efeitos primários da laserterapia, Lima *et al.*<sup>(16)</sup> demonstraram a capacidade do laser de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) de 670 nm em modular a inflamação, através da ação inibidora de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 nos períodos de 6 a 12 horas após a realização de um ferimento cutâneo no dorso de ratos.

De modo similar, Pereira *et al.* <sup>(3)</sup> investigaram a influência da TLBP (AsGaAl de 670 nm) sobre os mastócitos e a resposta vascular primária em ferimentos cutâneos padronizados em ratos Wistar. Seus resultados corroboraram os de Reis *et al.* <sup>(10)</sup> e evidenciaram redução significativa do edema 3 dias após a realização do ferimento cutâneo no grupo tratado com laser, em comparação com o grupo controle. Observou-se também maior número de mastócitos intactos e degranulados no grupo laser, nos 3 dias iniciais do processo de cicatrização. Os autores constataram uma diferença significativa na resposta inflamatória do grupo submetido à irradiação com laser, com elevados números de células polimorfonucleares nas primeiras horas do experimento, seguido do decréscimo deste infiltrado celular no terceiro dia pós-operatório.

Em 2010, Medrado *et al.* <sup>(13)</sup> investigaram os efeitos da laserterapia ( $\lambda$ 670nm) em células pluripotentes (pericitos) e seu papel durante o reparo tecidual cutâneo em um modelo experimental desenvolvido em ratos Wistar, nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias após realização de ferimento dorsal padronizado. Utilizando uma abordagem quantitativa, através da técnica de imuno-histoquímica associada à morfometria, os autores demonstraram a influência do laser na proliferação celular e na modulação fenotípica de pericitos em miofibroblastos até o 14º dia após a realização da ferida experimentalmente induzida.

Rambo *et al.* <sup>(17)</sup> descreveram que a TLBP foi efetiva na redução da expressão de mediadores pró-inflamatórios e no aumento da expressão da citocina anti-inflamatória, IL-10. Em seu estudo, os autores compararam grupos de ratos jovens e idosos irradiados e não-irradiados com o laser de baixa intensidade de 660 nm (grupos laser e controle, respectivamente) nos períodos de 3, 7 e 14 dias, após a realização do ferimento cutâneo. Suas análises histológicas confirmaram que houve infiltração precoce de células inflamatórias polimorfo e monomorfonucleares nos grupos laser e controle de ratos jovens e retardo na cicatrização cutânea em grupos laser e controle de ratos mais velhos. Desta forma, a variável idade exerceu um impacto determinante nos resultados descritos por estes autores. Tais achados divergem daqueles publicados por Lima *et al.* <sup>(16)</sup>, uma vez que tais autores documentaram uma significativa redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-

6), bem como da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo tratado com laser de baixa potência, 6 e 12 horas após a realização do ferimento cutâneo.

## **2.2 Variáveis da TLBP e sua ação no reparo**

Sabe-se que a determinação do correto comprimento de onda do laser, a dosimetria, fluência e a irradiância, são parâmetros de grande relevância. A depender da fluência ofertada à superfície do tecido, por exemplo, diferentes respostas teciduais podem ser observadas durante o processo de reparo<sup>(18)</sup>. Comprimentos de onda compreendidos entre 632,8 e 1000nm, têm sido descritos como aqueles que apresentam resultados mais satisfatórios no processo de cicatrização tecidual. Demidova-Rice *et al.*<sup>(19)</sup> em um estudo experimental desenvolvido em camundongos, no qual compararam diferentes comprimentos de onda na terapia com laser de baixa potência (635, 670, 720 e 820nm), constataram que os grupos irradiados com comprimento de onda de 820nm obtiveram uma estimulação mais acentuada da cicatrização.

No tocante à dosimetria, a fluência utilizada nos estudos com laser de baixa potência variam de 0,2 a 30 J/cm<sup>2</sup>. Doses compreendidas entre 3 a 6 J/cm<sup>2</sup> parecem apresentar resultados mais eficazes e doses acima de 10 J/cm<sup>2</sup> em uma única sessão, tem sido associadas a efeitos inibitórios ou até mesmo placebo. Demidova-Rice *et al.*<sup>(19)</sup> testaram doses de 1, 2, 10, e 50 J/cm<sup>2</sup> de laser de baixa potência (632,8 nm) em camundongos e observaram que, animais irradiados com 50 J/cm<sup>2</sup> apresentaram uma maior expansão da ferida nos primeiros dias e, apenas após 7 a 8 dias, esta retornou ao seu tamanho original. Os autores relataram que as doses de 2 e 10 J/cm<sup>2</sup> foram as que apresentaram maior benefício à cicatrização, e entre estas, a dose de 2 J/cm<sup>2</sup> exibiu resultados superiores.

## **2.3 Ação do laser sobre a neoangiogênese e o remodelamento**

A neoangiogênese é um processo biológico complexo, que depende do equilíbrio de fatores pró e anti-angiogênicos que influenciarão o estado proliferativo do endotélio em uma ampla variedade de doenças. Nos últimos anos, tem sido

demonstrada a influência positiva da terapia com laser de baixa intensidade na proliferação de células endoteliais durante processo da neoangiogênese, em especial na fase proliferativa do reparo<sup>(11,20)</sup>.

Em 1990, Maier *et al.*<sup>(21)</sup> observaram o crescimento e aparecimento de novos vasos sanguíneos mais calibrosos em animais irradiados com o laser de baixa potência. Comparando os grupos estudados, os autores encontraram diferença estatisticamente significativa nos animais irradiados em relação ao grupo controle, pois no grupo tratado também houve maior número de vasos neoformados.

Colombo *et al.*<sup>(11)</sup>, objetivaram avaliar os efeitos do laser de arseneto de gálio e alumínio ( $\lambda$  660 nm) sobre a maturação do tecido de granulação, com enfoque na neoangiogênese, na expressão de TGF- $\beta$  e na biossíntese da matriz colagênica, em tecido de roedores. Os autores concluíram que a terapia com laser de baixa potência influenciou positivamente a expressão de fatores de crescimento, corroborando com os demais artigos encontrados na literatura que evidenciam o aumento da neoangiogênese decorrente da laserterapia.

Em 2015, Halon *et al.*<sup>(20)</sup> descreveram a taxa de neoangiogênese na cicatrização de feridas após a exodontia dentária em pacientes HIV positivos submetidos ou não à terapia fotobioestimulante com laser diodo (820 nm). Os autores utilizaram punção aspirativa por agulha fina para coleta da amostra da mucosa oral e técnica de imuno-histoquímica com o anti-CD34 para avaliar através de microscopia óptica a expressão de novos vasos sanguíneos. Diferença estatisticamente significativa entre grupo laser e grupo controle em humanos infectados pelo HIV foi encontrada. O número de novos vasos encontrados no grupo de indivíduos irradiados, após seis dias do procedimento cirúrgico, foi consideravelmente maior que no grupo controle. Os autores concluíram ainda que o número de células CD4<sup>+</sup> não influenciou o processo da neoangiogênese, independente da irradiação com laser.

O VEGF tem sido descrito como um dos principais fatores de crescimento indutores da neoangiogênese. O mecanismo molecular subjacente a seu estímulo permanece ainda desconhecido, mas o VEGF pode estimular diretamente ambas as



células - endoteliais e fibroblastos<sup>(7,22)</sup>. Em seu experimento envolvendo sinalização celular, Feng *et al.*<sup>(22)</sup>, mostraram que tal fator pró-angiogênico foi um potente estimulador da vascularização e que a TLBP induziu a sua produção e conseqüentemente, a neoformação vascular. Contudo, alguns autores que documentaram resultados diferentes, sugerem que o efeito da TLBP sobre a neoangiogênese pode depender do comprimento de onda da luz laser utilizada<sup>(23)</sup>.

Em 2006, Tuby *et al.*<sup>(24)</sup>, demonstraram a estimulação da neoangiogênese pela regulação positiva de VEGF e síntese de óxido nítrico após o uso de luz laser com um comprimento de onda de 804 nm. Pereira *et al.* (2010), em um outro estudo experimental desenvolvido com ratos, corroboraram estes achados, uma vez que observaram que espécimes do grupo tratado com laser apresentaram áreas mais amplas coradas positivamente com o anticorpo anti-VEGF, entre 6 a 24 horas após a terapia laser, quando comparados com o grupo de ratos não irradiados. Entretanto, os autores descreveram também, uma redução do número de vasos após as primeiras 24 horas da aplicação do laser no ferimento cutâneo.

Sabe-se que a TLBP influencia a resposta inflamatória nos primeiros dias após a lesão, com o aumento do número de neutrófilos polimorfonucleares e mastócitos, vasodilatação, e aumento do número de vasos sanguíneos, acelerando assim o processo inflamatório e resultando numa cura mais rápida da ferida<sup>(3)</sup>. Porém, pouco se tem estudado em relação a ação do laser de baixa potência na fase tardia da cicatrização, que compreende o remodelamento da matriz extracelular. Entende-se que o aumento da produção de colágeno possa de fato ocorrer através de mecanismos de fotoestimulação, sobre os quais certas frequências/doses podem atuar, modulando assim a proliferação celular e elevando a quantidade de fatores de crescimento de fibroblastos<sup>(25)</sup>.

Medrado *et al.*<sup>(12)</sup> em 2008, publicaram os resultados de um trabalho experimental que utilizou o modelo clássico de cicatrização cutânea em ratos, o qual avaliou o processo de reparo fotobiomodulado por um período de até 60 dias após a realização de um ferimento cutâneo padronizado. Os autores demonstraram a ação biomoduladora do laser de arseneto de gálio e alumínio ( $\lambda$  670 nm) sobre a síntese de colágeno durante diferentes períodos do reparo. A terapia com laser de baixa

potência produziu um melhor padrão de organização das fibras de colágeno, fato este que se constitui um aspecto relevante que auxiliou na geração de força tênsil adequada para o tecido de ferida cirúrgica em formação (Figura 2). Tais autores sugeriram então que esta modalidade terapêutica poderia interagir de forma eficiente com os elementos da matriz extracelular, em especial no período inicial da cicatrização (Figura 3).

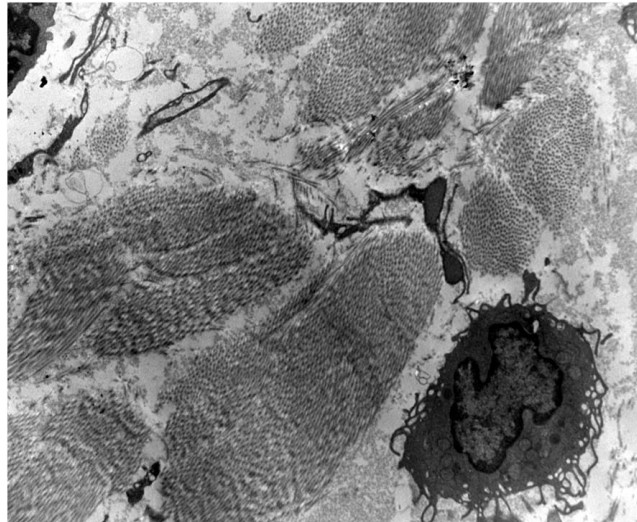


Figura 2 – Eletromicrografia que ilustra fibras colágenas de pele de rato, dispostas em feixes organizados e compactos na matriz extracelular, 10 dias após a indução de um ferimento cirúrgico (Microscopia eletrônica de Transmissão, 4500X).

Fonte: Profa. Dra. Alena Medrado

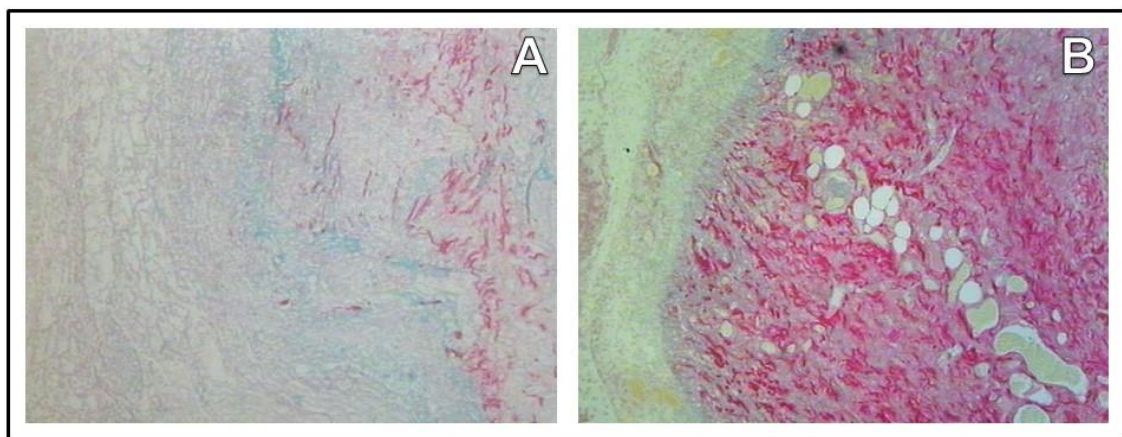


Figura 3 – Secção de pele de rato que evidencia síntese de colágeno 72 horas após a realização de ferimento cutâneo sem irradiação com laser (A) e com irradiação com laser de baixa potência (B) (Sírius vermelho, 100X).

Fonte: Profa. Dra. Alena Medrado

Nos achados de Baptista *et al.*<sup>(26)</sup>, investigou-se os efeitos do laser de GaAIs sobre a expressão do colágeno tipo IV no processo do remodelamento. Nos períodos de 14 e 21 dias, os autores não observaram mudanças significativas no padrão de distribuição do colágeno tipo IV entre os grupos controle e laser.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O laser de baixa potência tem demonstrado ser capaz de promover a modulação da inflamação, a neoangiogênese, proliferação epitelial e de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração do ferimento. Embora sua ação sobre os processos que se desenrolam nas etapas iniciais do reparo tecidual esteja bem descrita na literatura, novos estudos que contemplem a sua influência na fase tardia da cicatrização podem ser relevantes para determinar por quanto tempo os efeitos benéficos primários podem se perpetuar no tecido em formação.

## REFERÊNCIAS

1. Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. *Lasers Med Sci* 2009;24:113–116.
2. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T. In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta 1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol* 2008;39(1):37-47.
3. 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. *J Photochem Photobiol* 2010;98:188–192.
4. Liu XQ, Mao Y, Wang B, Lu XT, Bai WW, Sun YY, Liu Y, Liu HM, Zhang L, Zhao YX, Zhang Y. Specific matrix metalloproteinases play different roles in intraplaque angiogenesis and plaque instability in rabbits. *plos one*. 2014;9(9):1-10.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.
6. Baptista AP, Andrade ZA. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(2):183-185.
7. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Scie* 2013;72:206-17.
8. Andrade ZA, Baptista AP, Santana TS. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:267-272.
9. Loreti E H, Pascoal V L W, Nogueira B V, Silva I V, Pedrosa D F. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photom Laser Surg* 2015; 33: 104-116.
10. Reis SRA, Medrado AP, Marchionni AMT, Figueira C, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *photomed laser surg* 2008;26(4):307-313.
11. Colombo F, Valença Neto AAP, de Souza APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRA. Effect of low-level laser therapy ( $\lambda$ 660nm) on angiogenesis in wound healing: an immunohistochemical study on a rodent model. *Braz Dent Journ* 2013;24(4):308-312.

12. Medrado A P, Soares A P, Santos E T, Reis S R A, Andrade Z A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B: Bio* 2008; 92: 144-52.
13. Medrado A, Costa T, Prado T, Reis S, Andrade Z. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. *Photoderma Photoimmun Photomedic* 2010;26:192-197.
14. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *Dent Res* 2010;83:219–229.
15. Silva TS, Mendes F, Alves AMP, Alves EPB, Bertolini GRF. Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar tratados com laser de baixa potência. *Ver Bras Bioci.* 2010;8(3);264-267.
16. Lima AAM, Spínola LG, Baccan G, Correia K, Oliva M, Vasconcelos JF, Soares MBP, Reis SR, Medrado AP. Evaluation of corticosterone and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci* 2014;29:709-715.
17. Rambo C S M, Silva Jr J A, Serra A J, et al. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression. During the skin wound-repair process in Young and aged rats. *Lasers Med Sci* 2014;29:1723-1733.
18. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Med Sci* 2003;32:239–244
19. Demidova-Rice T N, Salomatina E V, Yaroslavsky A N, Herman I M, Hamblin M R. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 706-715.
20. Halon A, Donizy P, Dziegala M, Dobrakowski R, Simon K. Tissue laser biostimulation promotes post-extraction Neovascularization in HIV-infected patients. *Lasers Med Sci* 2015; 30: 701-706.
21. Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci* 1990; 5: 381-186.
22. Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cellul Signall* 2012; 24: 1116-1125.
23. Tachiara R, Farinelli WA, Anderson R. Low intensity light-induced vasodilation in vivo. *Lasers Surg Med* 2002; 30:11.
24. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and INOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardio protection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med* 2006; 38:682-688.

25. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. ver. col. bras. cir. 2014;41(2):129-133.
26. Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Júnior DS, Ferrari RAM. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. Photomed Las Surg 2011; 29: 11–17.

**MANUSCRITO II****EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER DE 670 nm SOBRE A DENSIDADE VASCULAR E A FIBROPLASIA NA FASE TARDIA DO REPARO TECIDUAL*****EFFECT OF 670 nm LASER PHOTOBIMODULATION ON VASCULAR DENSITY AND FIBROPLASIA IN LATE STAGES OF TISSUE REPAIR***

Tila Fortuna<sup>1</sup>, Ana Cristina Gonzalez <sup>2</sup>, Maíra Ferreira Sá<sup>3</sup>, Zilton de A. Andrade<sup>4</sup>,  
Sílvia R. A. Reis<sup>5</sup>, Alena R. A. P. Medrado<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> Mestranda em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>2</sup> Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>3</sup> Cirurgiã-dentista pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil
- <sup>4</sup> Chefe do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Salvador, Bahia, Brasil.
- <sup>5</sup> Professora adjunto do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.



## RESUMO

**Objetivo:** Investigar os efeitos da terapia com laser de AsGaAl (670nm) na neoangiogênese e fibroplasia, durante o remodelamento tecidual. **Métodos:** 40 ratos Wistar, machos, foram submetidos à cirurgia cutânea e alocados em dois grupos experimentais, Controle e Laser (9 mW, 670 nm, 0,031 W/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup>). Após 14, 21, 28 e 35 dias os animais foram eutanasiados. Em secções coradas com hematoxilina-eosina e sírius vermelho, foram realizadas análises descritiva e quantitativa, respectivamente. Através de análise imuno-histoquímica e histomorfométrica, foram avaliadas as populações de células VEGF+ e CD31+. Foi realizada estatística através dos testes de Mann-Whitney, Friedman e correlação de Spearman, com  $p < 0,05$ . **Resultados:** A expressão do colágeno foi significativamente maior no grupo Laser, quando comparado ao Controle nos dias 14 e 21, após a realização do ferimento cutâneo ( $p=0,008$ ;  $p=0,016$ ) e no grupo Controle, nos períodos compreendidos entre 14 e 28 e 14 e 35 dias ( $p=0,001$ ;  $p=0,007$ ). Houve maior número de vasos sanguíneos apenas no grupo tratado, em três períodos do estudo com significância estatística no dia 14 ( $p=0,016$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa do número de células VEGF+ nos diferentes grupos experimentais ao longo do estudo, embora este tenha apresentado correlação positiva com a área de colágeno nos dias 14 e 28 ( $p=0,037$ ). **Conclusão:** O Laser foi capaz de interferir no curso tardio da cicatrização, particularmente no tocante à expressão do colágeno e número de vasos neoformados. Células VEGF+ estiveram presentes em ambos os grupos experimentais e o VEGF pareceu influenciar a fibroplasia no grupo tratado.

**Palavras-Chave:** Moduladores da angiogênese. Indutores da angiogênese. Terapia a laser de baixa intensidade. Terapia a laser.

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effects of GaAIIAs (670nm) laser therapy in neoangiogenesis and fibroplasia during tissue remodeling. **Methods:** 40 male Wistar rats underwent cutaneous surgery and were divided into two experimental groups, Control and Laser (9 mW, 670 nm, 0.031 W/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup>). After 14, 21, 28 and 35 days the animals were euthanized. In sections stained with hematoxylin-eosin and sirius red, descriptive and quantitative analyzes were performed, respectively. By immunohistochemistry and histomorphometric analysis populations VEGF+ and CD31+ cells were evaluated. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney, Friedman and Spearman correlation test,  $p < 0.05$ . **Results:** The collagen expression was significantly higher in the laser group compared to the control on days 14 and 21 after the completion of the skin wound ( $p = 0.008$ ;  $p = 0.016$ ) and in the control group, in the periods between 14, 28 and 14 and 35 days ( $p = 0.001$ ;  $p = 0.007$ ). Only in the treated group there were more blood vessels in three periods of the study, with statistical significance at day 14 ( $p = 0.016$ ). There was no statistically significant difference in VEGF+ cell count in the different experimental groups throughout the study, although it has presented a positive correlation with the area of collagen on days 14 and 28 ( $p = 0.037$ ). **Conclusion:** Laser was able to interfere in the late course of healing, particularly with regard to collagen expression and the number of newly formed vessels. VEGF+ cells were present in both experimental groups and VEGF appear to influence fibroplasia at the treated group.

**Keywords:** Modulators of angiogenesis. Inducers of angiogenesis. Low-level laser therapy. Laser Therapy.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os anos 60, o laser de baixa potência vem sendo descrito como um importante modulador do reparo tecidual<sup>(1)</sup>. Dentre os diversos benefícios promovidos pela laserterapia encontram-se o estímulo à biossíntese de integrantes da matriz extracelular, mitose de diversos tipos celulares e neoangiogênese<sup>(1-3)</sup>. Os efeitos biológicos da fotobiomodulação laser, convencionalmente, podem ser divididos a curto e longo prazo. As respostas a curto prazo são aquelas nas quais o efeito pode ser observado poucos segundos ou minutos após a irradiação, como por exemplo, o aumento na geração de ATP mitocondrial. Já os efeitos observados a longo prazo são aqueles que ocorrem horas ou ainda dias após o final da irradiação e, usualmente, envolvem nova biossíntese celular, especialmente na fase proliferativa do processo cicatricial<sup>(4)</sup>.

Foi demonstrado em alguns modelos experimentais, que a neoangiogênese representa um processo crítico para a biossíntese do colágeno e sua posterior maturação<sup>(5)</sup>. Durante a fase proliferativa da cicatrização, a microvasculatura da ferida também é construída de forma a reestabelecer o fornecimento de nutrientes para a regeneração do tecido, promover a fibroplasia e prevenir a hipóxia tecidual<sup>(6)</sup>. De fato, a hipóxia é o principal estímulo fisiológico da neoangiogênese, pois resulta na ativação de fatores pró-angiogênicos, a exemplo do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), que se ligam a receptores presentes nas células endoteliais, células de músculo liso e em pericitos. Essa interação ligante-receptor ativa as células e promove o brotamento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes<sup>(7)</sup>.

Ainda não está esclarecido na literatura até que ponto a ação do laser nas primeiras fases da cicatrização poderia se perpetuar durante o reparo tardio, em especial, na etapa de remodelamento da matriz extracelular. Medrado et al<sup>(8)</sup>. em 2008, demonstraram, em um modelo experimental clássico de cicatrização cutânea, que o grupo de animais irradiados com laser de baixa potência apresentou alterações no padrão de organização do colágeno até cerca de 14 dias após a realização do ferimento circular padronizado. Neste estudo, não foi possível

correlacionar a fibroplasia com a formação de novos brotos vasculares no leito do ferimento, nem mensurar quantitativamente tais variáveis ao longo da fase de remodelamento tecidual.

O objetivo deste trabalho é investigar os efeitos da terapia com laser de arseneto de gálio e alumínio de 670nm sobre a neoangiogênese e a fibroplasia durante a fase de remodelamento tecidual, em ratos.

## 2 METODOLOGIA

Os procedimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador-Bahia, sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) sob número 0074/2015.

### 2.1 Grupos experimentais

Foram utilizados 40 ratos machos tipo Wistar, *Rattus norvegicus albinus*, pesando 200-230g, que ficaram alojados em jaulas individuais com boas condições de iluminação e temperatura ( $\pm 26^{\circ}\text{C}$ ) submetidos a uma dieta comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Todos os animais tiveram seus dorsos limpos com solução antisséptica e foram tricotomizados. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (Vetbrands, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil) na proporção de 90mg/kg e 5mg/kg, respectivamente por via intraperitoneal. Uma porção circular da pele foi removida utilizando-se um bisturi circular de 8 mm de diâmetro (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) para a obtenção de uma ferida cirúrgica uniforme e bem delimitada no centro da área tricotomizada.

Os animais foram então alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais:

**Grupo Controle:** Animais submetidos a simulação de irradiação com Laser, porém com aparelho desligado.

**Grupo Laser:** Animais irradiados com aparelho de Laser diodo semiconductor de arseneto de gálio e alumínio (ASGaAl) em emissão contínua (9mW, 670 nm,  $0,031\text{W}/\text{cm}^2$ ), com área da ponta ativa do aparelho de  $0,28\text{ cm}^2$  (Laser VR-KC-610 – Dentoflex, Brasil) e fluência da ordem de  $4\text{ J}/\text{cm}^2$ . Quatro administrações de  $1\text{ J}/\text{cm}^2$  em pontos equidistantes da borda a ferida circular foram realizadas, totalizando  $4\text{ J}$

cm<sup>2</sup> por sessão, durante três dias alternados, por quatro sessões, até que se obtivesse uma dose total de 16 J/cm<sup>2</sup>. O tempo de irradiação foi de 31 segundos por ponto de aplicação e totalizou 124 segundos, por sessão.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> nos períodos de 14, 21, 28 e 35 dias após serem submetidos a cirurgia cutânea, conforme listado na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos e respectivos dias de eutanásia

Grupos Experimentais	Períodos de Eutanásia			
	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
Controle (n=20)	5	5	5	5
Laser 4 J/cm <sup>2</sup> (n=20)	5	5	5	5

## 2.2 Histologia

Os fragmentos da pele, incluindo a margem do ferimento e tecido subcutâneo foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada a 4%, com pH 7,4, por um período de vinte e quatro horas. Seguiu-se a utilização de álcool à 70%, para continuação do processamento histológico, até inclusão em blocos de parafina. Os fragmentos teciduais foram então cortados em micrótomo, obtendo-se cortes com 4 µm de espessura para a realização dos testes imuno-histoquímicos e coloração com hematoxilina-eosina (HE) e sírius vermelho.

## 2.3 Imuno-histoquímica

As lâminas foram previamente tratadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Foi realizada a padronização de todos os anticorpos utilizados no estudo, conforme especificado na tabela 2. O método de imunomarcção utilizado foi o da peroxidase.

Tabela 2 - Relação dos anticorpos utilizados no estudo e suas especificações.

Anticorpo	Diluição	Padrão	Especificação	Fonte	Imunolocalização
Anti-CD31	1:1000	++	SC-1506	Stª Cruz Biotech	Citoplasma
Anti-VEGF	1:50	++	Clone VG1	Neomarkers	Citoplasma

Os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xilol, reidratados com álcool absoluto e depois com água, à temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato 10 mM, pH 6,0 em banho-maria a 96°C, com posterior bloqueio da peroxidase endógena, utilizando o Dako Dual Enzyme Block (Dako, Carpinteria, CA, EUA).

A eliminação das ligações inespecíficas foi realizada com Protein Block Serum Free (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e assim, os cortes foram incubados a 4°C com os anticorpos primários, em câmara úmida por uma noite.

O anticorpo secundário foi o Polymer Dako Envision Peroxidase (Dako, Carpinteria, CA, EUA) incubado por 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada através de DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3%. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com Bálsamo do Canadá.

Adotou-se uma graduação semiquantitativa padrão para indicar a intensidade da reação imuno-histoquímica, na qual 0 foi descrito como ausência de reatividade, + (discreto), ++ (moderado) e +++ (intenso).

## 2.4 Histomorfometria

A histomorfometria foi realizada em imagens do tecido cutâneo lesado, capturadas através do *software* Motic Images Advanced 5.0. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 7864,3200 pixels. Cinco áreas de cada secção, selecionadas a partir do centro da lesão, foram analisadas. Foram mensuradas células VEGF+ individuais e através da marcação com o CD31+,

realizou-se a quantificação do número de vasos sanguíneos. A objetiva utilizada foi a de 40X.

A análise foi feita pelo programa Adobe Photoshop CS6 Extended, Versão 2015 (Adobe Systems Incorporated, EUA) que quantifica a porcentagem de tecido corado. Em seguida, estes dados foram comparados em relação à área total selecionada. Todas as análises foram feitas às cegas, por um examinador calibrado para evitar viés de tendenciosidade.

## **2.5 Análise estatística**

Considerando que o desfecho primário do estudo fosse representado pelo número de células endoteliais positivas para a imunomarcação realizada e que a menor diferença entre os grupos considerasse no grupo controle 7 células por campo e no grupo de animais irradiados 12 células por campo, com desvio padrão de 5, alfa de 5% e poder do estudo de 80%, estimou-se para a amostra 20 animais por grupo.

Foi criado um banco de dados no Excel 2016, o qual foi analisado no *software* R (versão 3.3.0). Foi feita uma análise descritiva (média, desvio padrão, mediana e quartis) com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada. Adotou-se o teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade da distribuição dos dados, além da verificação curtose, assimetria e o coeficiente de variação.

Para identificar associações estatisticamente significantes entre os grupos de estudo, usou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e para identificar a existência de diferenças significativas nas contagens de células positivas para VEGF, CD-31 e expressão de colágeno, de acordo com o tempo de sacrifício e estratificação por grupo, foi usado o teste de Friedman seguido pelo teste post-hoc de Dun. O estudo da correlação das variáveis foi realizado através do teste de Spearman. O nível de significância adotado para este trabalho foi 5%.



### 3 RESULTADOS

As secções teciduais coradas com HE, em todos os diferentes períodos de sacrifício evidenciaram um tecido rico em matriz extracelular, povoado por células fusiformes e com presença de vasos sanguíneos, característico da fase de remodelamento tecidual, sem alterações significativas entre os diferentes grupos experimentais (Figura 1A-D).

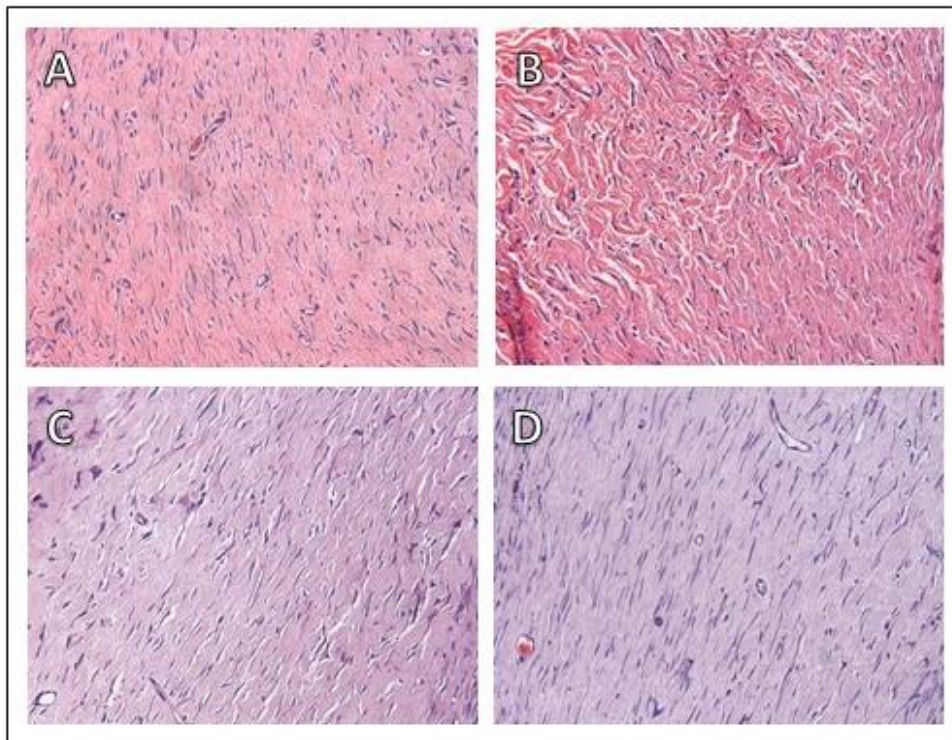


Figura 1 - Área correspondente ao ferimento cutâneo que evidencia a fibroplasia. A) Grupo Controle, 21 dias após ferimento cutâneo. B) Grupo Laser, 21 dias. C) Grupo Controle, 35 dias após ferimento cutâneo. D) Grupo Laser, 35 dias (Hematoxilina-eosina, 400X).

Fonte: Própria autora

Apesar de em todos os períodos de sacrifício terem sido observadas nas secções teciduais coradas com sírius vermelho, maior quantidade de colágeno no grupo Laser quando comparado ao grupo Controle, esta diferença foi significativa apenas no período de 14 e 21 dias, após a realização do ferimento cutâneo ( $p=0,008$ ;  $p=0,016$ ); (Figura 2A-D). Houve diferença estatisticamente significativa na expressão de colágeno, referente aos períodos estudados, apenas no grupo controle, entre 14 e 28 e 14 e 35 dias ( $p=0,001$ ;  $p=0,007$ ); (Tabela 3).

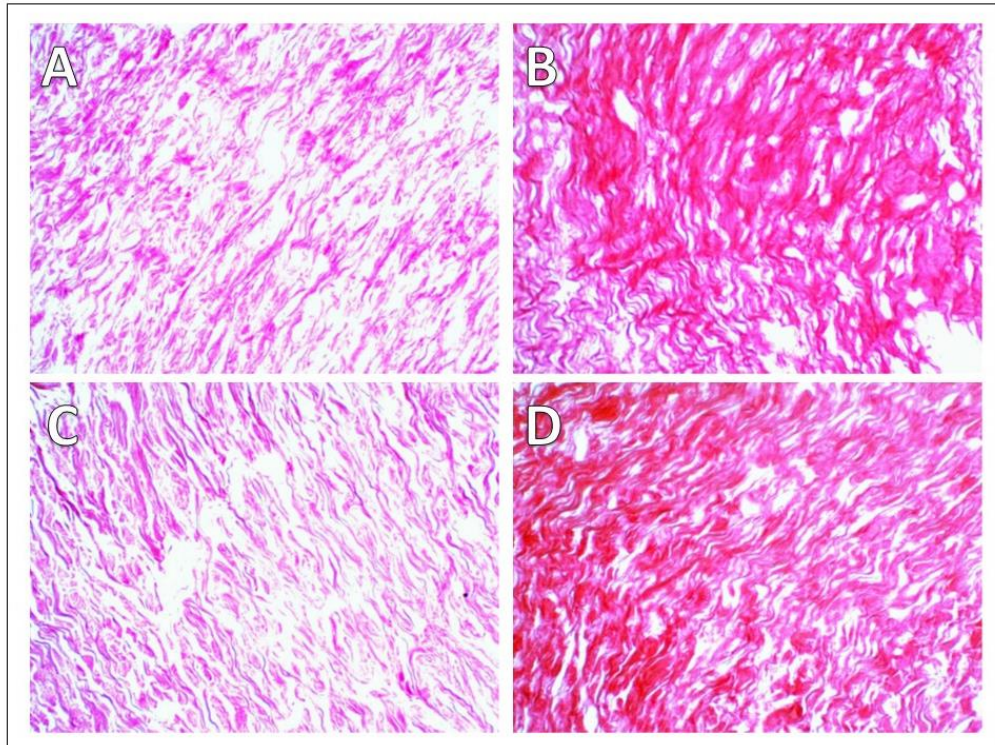


Figura 2 – Expressão da matriz colagênica corada em vermelho correspondente ao período de 14 dias (A-B, grupos Controle e Laser, respectivamente) e 21 dias (C-D, grupos Controle e Laser, respectivamente), após a realização do ferimento cutâneo (Sírius vermelho, 400X).

Fonte: Própria autora

Tabela 3 - Expressão quantitativa de colágeno nos diferentes períodos do estudo nos grupos experimentais Controle e Laser.

Período de eutanásia (dias)	Grupo experimental	Mediana	Q1-Q3	p
14	Controle	1876 <sup>a</sup>	947-2648	0,008*
	Laser	3949	3698-4279	
21	Controle	2885	2315-3272	0,016*
	Laser	3828	3666-4608	
28	Controle	3325 <sup>b</sup>	3257-4437	0,222
	Laser	3828	3766-4705	
35	Controle	3198 <sup>b</sup>	2657-3986	0,421
	Laser	4280	3252-4424	

\* Teste Mann-Whitney; estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

<sup>ab</sup> Diferença estatisticamente significativa no grupo Controle nos dias 14 e 28 ( $p=0,001$ ) e 14 e 35 dias ( $p=0,007$ ).

Com relação ao marcador endotelial anti-VEGF, a sua imunomarcação apresentou um padrão que variou de moderado a intenso, em ambos os grupos estudados. Células VEGF+ foram visualizadas tanto nos contornos dos vasos sanguíneos como na matriz extracelular adjacente (Figura 3A). Células fusiformes isoladas e dispersas na matriz dérmica, por vezes com morfologia estrelada ou romboidal, também exibiram um padrão de marcação positivo (Figura 3B). Embora o quantitativo de células VEGF+ tenha sido maior no grupo Laser nos períodos de 14, 21 e 28 dias, este achado não foi estatisticamente significativo quando comparado àqueles observados no grupo Controle ( $p>0,05$ ); (Figuras 3C-D); (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da expressão de células VEGF+ nos diferentes períodos do estudo nos grupos experimentais Controle e Laser.

<b>Período de eutanásia (dias)</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q1-Q3</b>	<b>P</b>
<b>14</b>	Controle	220,8	188,1-345,1	0,421
	Laser	280,5	234,5-298,5	
<b>21</b>	Controle	208,3	167,1-231,3	0,690
	Laser	251,8	41,3-318,2	
<b>28</b>	Controle	183,3	116,6-187,7	0,421
	Laser	189,9	63,2-371,4	
<b>35</b>	Controle	275,0	196,0-417,4	0,151
	Laser	193,5	138,9-221,1	

\* Teste Mann-Whitney; estatisticamente significativo  $p<0.05$ .

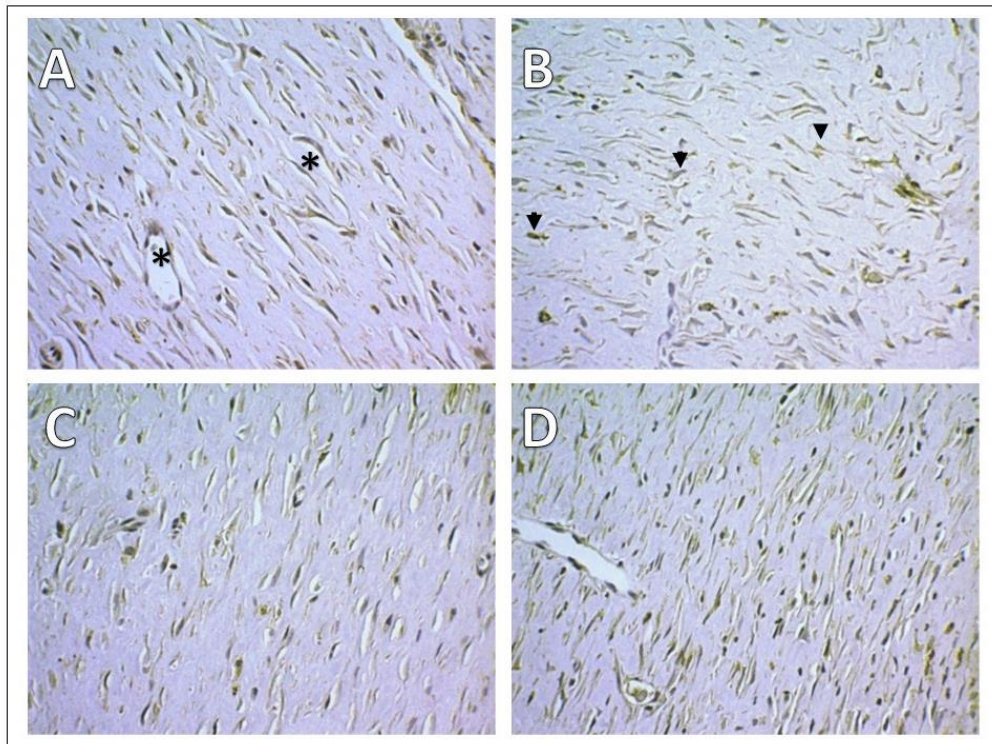


Figura 3 – Expressão de células VEGF+ na área correspondente à fibroplasia. (A) No contorno de pequenos capilares (asteriscos), (B) Como entidades isoladas dispersas na matriz conjuntiva (setas) (C-D) Grupos Controle e Laser, 21 dias, respectivamente (Imuno-histoquímica, anti-VEGF, 400X).  
Fonte: Própria autora

Na área correspondente à fibroplasia, capilares sanguíneos delimitados por células CD31+ foram visualizados até o 35º dia (Figura 4A). Houve um maior número de vasos no grupo tratado em relação ao grupo Controle no 14º dia após o ferimento cutâneo ( $p=0,016$ ). Nos períodos subsequentes, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figuras 4B-C). No grupo submetido à fotobiomodulação, observou-se diferença estatisticamente significativa relativa ao número de vasos entre os períodos de 14 e 35 ( $p=0,014$ ) e de 21 e 35 dias ( $p=0,020$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de vasos sanguíneos encontrados durante os diferentes períodos do estudo, nos grupos experimentais Controle e Laser.

Período de eutanásia (dias)	Grupo experimental	Mediana	Q1-Q3	p
14	Controle	6,000	5,500-7,000	0,016*
	Laser	9,000 <sup>a</sup>	7,500-10,000	
21	Controle	9,000	6,500-9,000	0,421
	Laser	9,000 <sup>a</sup>	8,500-9,500	
28	Controle	8,000	6,500-9,000	0,548
	Laser	9,000	6,500-10,000	
35	Controle	8,000	6,500-10,500	0,151
	Laser	6,000 <sup>b</sup>	5,500-7,500	

\* Teste Mann-Whitney; estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

<sup>ab</sup> Diferença estatisticamente significativa no grupo Laser nos dias 14 e 35 ( $p=0,014$ ) e 21 e 35 dias ( $p=0,020$ ).

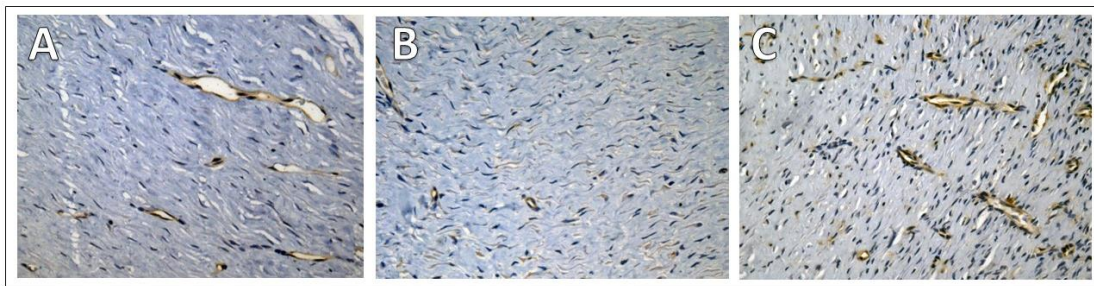


Figura 4 – Expressão de células CD31+ em capilares sanguíneos na área correspondente à fibroplasia. (A) Grupo Laser, 35 dias, (B-C) grupos Controle e Laser, 14 dias, respectivamente (Imuno-histoquímica, anti-CD31, 400X).

Fonte: Própria autora

No estudo de correlação que abrangeu as variáveis colágeno e células VEGF+, observou-se que esta foi positiva apenas no grupo Laser, nos períodos correspondentes a 14 ( $p=0,037$ ), 21 ( $p=0,391$ ) e 28 ( $p=0,037$ ) dias, e negativa no dia 35 (Tabela 6). No grupo Controle, não foi observada correlação positiva entre estas variáveis em nenhum período do estudo. Ao analisar as variáveis, colágeno e número de vasos sanguíneos, constatou-se que a correlação foi negativa nos grupos experimentais nos diferentes períodos do estudo, à exceção do dia 14 para o grupo tratado e do dia 35, para o grupo Controle, embora sem significância estatística.

As variáveis células VEGF+ e número de vasos, quando correlacionadas, apresentaram valores positivos no grupo Laser nos períodos de 21, 28 e 35 dias, embora este dado não fosse estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). No grupo Controle, esta mesma relação foi positiva apenas no dia 35 ( $p = 0,037$ ) (Tabela 7).

Tabela 6 – Correlação da área de colágeno com células VEGF+ e vasos sanguíneos nos grupos experimentais Controle e Laser.

	Colágeno							
	14 dia	p	21 dia	p	28 dia	p	35 dia	p
<b>VEGF Controle</b>	-0,600	0,285	-0,300	0,624	-0,100	0,873	-0,100	0,873
<b>VEGF Laser</b>	0,900	0,037*	0,500	0,391	0,900	0,037*	-0,900	0,037*
<b>Nº vasos Controle</b>	-0,300	0,624	-0,447	0,450	-0,616	0,269	0,300	0,624
<b>Nº vasos Laser</b>	0,400	0,505	-0,224	0,718	-0,154	0,805	-0,359	0,553

\* Correlação de Spearman; estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Tabela 7 – Correlação entre células VEGF+ e vasos sanguíneos nos grupos experimentais Controle e Laser.

	Número de vasos sanguíneos							
	14 dias	p	21 dia	p	28 dia	p	35 dia	p
<b>VEGF Controle</b>	-0,671	0,215	-0,335	0,581	-0,205	0,741	0,900	0,037*
<b>VEGF Laser</b>	-0,500	0,391	0,671	0,215	0,103	0,870	0,667	0,219

\* Correlação de Spearman; estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 4 DISCUSSÃO

Há evidências crescentes de que as alterações celulares, bioquímicas e moleculares que se desenvolvem precocemente em um tecido submetido à uma agressão, muitas vezes se perpetuam por mais tempo durante o reparo tecidual<sup>(9)</sup>. O aspecto clínico final de um ferimento pode não corresponder à ocorrência simultânea de fenômenos biológicos complexos que se desenrolam no contexto cicatricial. Sendo assim, a presente investigação objetivou caracterizar a densidade vascular e o processo de fibroplasia em fases mais avançadas do reparo tecidual. Em adição a este aspecto, foi investigado se os efeitos primários desencadeados pelo laser de baixa potência poderiam se perpetuar com o avançar do reparo.

Embora a deposição inicial de fibras colágenas seja desorganizada, a nova matriz de colágeno torna-se mais orientada e reticulada ao longo do tempo e sua subsequente organização é completada durante os estágios finais da fase de remodelação, que pode durar até um, dois ou mais anos, a depender do tecido em questão<sup>(9)</sup>. Em um estudo desenvolvido por Medrado *et al.*<sup>(10)</sup>, estes autores descreveram a fotobiomodulação resultante da ação de um laser de 670 nm, na pele de ratos e observaram um significativo incremento da transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, durante a evolução da cicatrização. No entanto, os autores investigaram apenas as fases iniciais do reparo e estenderam a sua análise até o 14<sup>o</sup> dia. Posteriormente, em 2008, os mesmos autores<sup>(8)</sup> avaliaram a cicatrização cutânea agravada pela ação do dióxido de silício até 60 dias após a indução do ferimento cutâneo padronizado, em ratos. Embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais nos períodos mais avançados do reparo, correspondentes a 30 e 60 dias, algumas alterações discretas referentes à neoangiogênese e ao padrão de organização das fibras colágenas foram descritas. Tais autores relataram a presença de muitos vasos sanguíneos que ainda podiam ser vistos na área da fibroplasia. Este fato instigou a realização do presente estudo que abordou outros períodos da cicatrização, como 21, 28 e 35 dias a fim de detectar possíveis achados histopatológicos relacionados à fibroplasia e neoangiogênese.

Os efeitos da terapia com laser de baixa potência (TLBP) sobre a biossíntese

do metabolismo do colágeno têm sido divergentes na literatura. Alguns autores<sup>(11,12)</sup> têm demonstrado o aumento na síntese de colágeno, enquanto outros<sup>(13,14)</sup> descrevem a redução deste processo. Em 2003, Pugliese *et al.*<sup>(15)</sup> avaliaram a ação do laser de baixa potência sobre a inflamação e formação de colágeno durante os períodos de 3 a 14 dias após a realização de ferimento cutâneo em ratos. Os autores realizaram uma análise semiquantitativa do colágeno e das fibras elásticas existentes na matriz extracelular, através de microscopia de luz. Foram observadas fibras colágenas mais espessas e bem organizadas no grupo tratado com Laser. Tais achados corroboram os resultados de outros autores<sup>(16)</sup>. Contudo, nenhum destes estudos avaliou quantitativamente a deposição de colágeno durante a fase do remodelamento tecidual, em especial no microambiente cutâneo. No presente estudo, entretanto, pode-se observar a ação fotobiomoduladora do laser, uma vez que houve maior expressão de fibras colágenas neste grupo quando comparado ao Controle, em dois períodos específicos, 14 e 21 dias. Tal fato sugere que os efeitos primários resultantes da estimulação pelo laser, como o aumento do número de fibroblastos, miofibroblastos e expressão de colágeno, já descritos por Medrado *et al.*<sup>(17)</sup> em 2010, ainda se faziam presentes, mesmo após a interrupção da terapia com Laser de baixa potência após a 4ª sessão de aplicação deste. Este achado é muito relevante do ponto de vista biológico, uma vez que indica que os “ganhos” iniciais provenientes da ação do Laser, já documentados na literatura, podem impactar no padrão de cicatrização por um período relativamente longo. Outros estudos<sup>(16,18,19)</sup> ratificaram a ação biomodulatória do Laser sobre a matriz colagênica em várias subespecialidades de tecido conjuntivo, em especial naqueles onde o reparo tecidual demora um período de tempo maior para ocorrer.

O que poderia justificar a perpetuação da maior biossíntese de colágeno obtido nos períodos iniciais, no grupo Laser? Várias hipóteses têm sido propostas na literatura científica. Segundo Iba *et al.*<sup>(20)</sup>, a participação de mediadores químicos sintetizados pelos mastócitos parece exercer um impacto decisivo no remodelamento das fibras colágenas. Tais autores investigaram o papel dos mastócitos na cicatrização de feridas cutâneas, utilizando ratos com deficiência de mastócitos. Após 20 dias da realização do ferimento cutâneo circular, os autores não observaram diferença estatisticamente significativa na contração da ferida nos dois grupos experimentais estudados. Entretanto, no período de 15 dias, foi percebido



que no grupo Controle, os mastócitos estavam presentes abundantemente nas bordas da ferida onde houve também maior deposição de colágeno, e ausentes na área correspondente ao centro da lesão. Tais resultados sugeriram a possibilidade da participação dos mastócitos na fase de remodelamento tecidual, embora eles não tenham utilizado a TLBP. No entanto, Pereira *et al.* <sup>(21)</sup> em um estudo realizado com laser de 670 nm, observaram a influência da TLBP no número de mastócitos e em sua degranulação no leito do ferimento cutâneo em ratos. Os autores encontraram quantidade significativamente maior de mastócitos no grupo Laser, quando comparado ao Controle, minutos após a realização da fototerapia. Constataram maior contingente de células degranuladas no terceiro dia após o procedimento cirúrgico. É fato que a participação de mastócitos não foi objeto de estudo na presente pesquisa. Contudo, sugere-se que tais células possam ter influenciado a fibroplasia na área da ferida, uma vez que a relação mastócito/colágeno tem sido bem documentada na literatura<sup>(22,23)</sup>, em especial sob a influência da terapia com laser de baixa potência.

Alie-se a esta hipótese, a possível ação modulatória de fatores de crescimento implicados na biossíntese do colágeno, como Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ), por exemplo. Abe *et al.*<sup>(24)</sup> afirmaram que o TGF- $\beta$  exógeno foi capaz de estimular a transdiferenciação e atividade sintética *in vitro* de fibrócitos humanos em fibroblastos ou miofibroblastos e desta forma, indiretamente influenciar na produção de colágeno. No entanto, alguns estudos<sup>(25,26)</sup> têm demonstrado que a TLBP pode também diminuir a expressão de TGF- $\beta$  durante o período de remodelamento tecidual, o que impediria uma fibrose excessiva. No presente trabalho, a cinética da biossíntese de colágeno no grupo Controle, obedeceu ao padrão normal esperado descrito na literatura e apresentou aumento gradativo ao longo do tempo, diferente do grupo Laser, que no 14<sup>o</sup> dia já apresentava maior expressão de fibras colágenas em relação ao Controle. Adicionalmente, há evidências de que os fibroblastos podem secretar enzimas que degradam a matriz extracelular (MEC), incluindo as metaloproteinases da matriz (MMP)<sup>(6)</sup>. Em um estudo experimental realizado por Guerra e colaboradores<sup>(27)</sup> foi investigada a ação do laser de 830 nm com emissão contínua e pulsátil, sobre as MMPs e a síntese de colágeno em tendões de Aquiles de ratos nos períodos de 8 a 15 dias e tais autores observaram o aumento das MMP 2 e 9 no grupo tratado com

laser, assim como concomitante aumento na biossíntese do colágeno. Embora, este aspecto não tenha sido investigado no presente estudo, torna-se relevante a realização de novas pesquisas neste âmbito a fim de ampliar a compreensão da participação de fatores de crescimento e metaloproteinases da matriz sob a ação da TLBP, em especial nas etapas tardias do reparo tecidual.

Outro evento importante no processo de cicatrização de feridas é a neoangiogênese. O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é um fenômeno fundamental para a formação do tecido de granulação, uma vez que é responsável por fornecer o oxigênio e os nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular na área da ferida<sup>(28)</sup>. A hipóxia tecidual tem sido apontada como um gatilho crítico sobre a transcrição de fatores neoangiogênicos. Além desta variável, foi demonstrado que a biossíntese e a maturação da matriz de colágeno influenciam na resistência à tração do tecido em cicatrização e estão diretamente relacionadas à pressão parcial do oxigênio no tecido<sup>(29)</sup>.

No presente estudo, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-CD31 para determinar o quantitativo de vasos sanguíneos e desta maneira, a densidade vascular no tecido submetido à injúria mecânica. Tal fenômeno biológico mostrou-se presente na fase de remodelamento da matriz, tanto em animais tratados como em controles normais. A neoangiogênese, ou seja, a formação de novos capilares a partir dos pré-existentes, é um componente essencial para a cicatrização devido ao aumento da demanda de nutrientes<sup>(30)</sup>. Segundo Andrade<sup>(31)</sup> em 2013, trata-se de um processo que exerce um impacto positivo no remodelamento de feridas. Observou-se que a máxima neoangiogênese aconteceu no período de 14 dias no grupo de animais irradiados com Laser, quando comparado ao Controle ( $p < 0,05$ ). A permanência de vasos no microambiente da lesão, neste período, pode ter contribuído não só para garantir o maior aporte de oxigênio e nutrientes, mas, também para o repovoamento celular neste local<sup>(17)</sup>, uma vez que os brotos capilares trazem consigo células tronco hematopoiéticas. Ao longo do processo de cicatrização, observou-se que o contingente de vasos diminuiu e que este parece não ter influenciado decisivamente a fibroplasia, uma vez que não foi observada correlação significativa entre estas variáveis.

Entre os fatores de crescimento envolvidos na neoangiogênese, o VEGF, o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), o Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (bFGF), o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), o Fator de Crescimento de Células Endoteliais Derivado de Plaquetas (PDECGF) e o TGF- $\beta$  tem sido descritos na literatura, sendo o VEGF um fator determinante para a diferenciação de células endoteliais e para o desenvolvimento da vascularização na área acometida pela agressão. Os demais fatores parecem ter apenas papéis complementares na indução, divisão, migração e diferenciação das células endoteliais<sup>(32)</sup>. No presente modelo experimental cutâneo em ratos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados no tocante ao quantitativo de células VEGF+ ( $p > 0,05$ ), embora este número tenha sido maior no grupo Laser nos períodos de 14, 21 e 28 dias. No entanto, o estudo de correlação entre a área do colágeno e a presença de células VEGF+ apresentou coeficiente positivo com significância estatística apenas no grupo de animais tratados com TLBP, nos períodos correspondentes a 14 e 28 dias, fato este que pode sugerir uma possível influência deste fator de crescimento sobre o processo da fibroplasia fotobiomodulada. No entanto, outros fatores de crescimento além do VEGF, que não foram inferidos nesta análise, também poderiam interferir no reparo e contribuir para a fibroplasia. Por exemplo, Colombo e colaboradores<sup>(33)</sup>, descreveram o efeito pró-angiogênico do TGF- $\beta$  no grupo Laser, constatado pelo aumento de vasos neoformados no leito do ferimento cutâneo de ratos, já no segundo dia após o procedimento cirúrgico.

Martignago *et al.*<sup>(12)</sup> em 2015, avaliaram a influência de diferentes doses do laser diodo arseneto de gálio ( $\lambda$  904 nm) na expressão de genes de colágeno tipo I e do VEGF em fibroblastos de ratos cultivados *in vitro*, a fim de correlacioná-los com o processo de cicatrização. Em seus resultados os autores relataram diferença estatisticamente significativa na expressão de genes de colágeno para os ratos do grupo Laser irradiado com 2 J/cm<sup>2</sup> em comparação ao grupo Controle. Com relação à expressão do gene VEGF, houve diferença estatisticamente significativa no grupo tratado com Laser em comparação ao grupo Controle, apenas nas primeiras 48 horas de irradiação. Tais autores concluíram que o aumento da expressão de genes de colágeno e de VEGF, estão intimamente relacionados à cicatrização, participando diretamente do remodelamento tecidual e da neoangiogênese.

Outro estudo realizado por Cury *et al.*<sup>(34)</sup> em 2013, avaliou os efeitos do laser de 660 nm e 780 nm sobre três importantes mediadores que são ativados durante a neoangiogênese, VEGF, Fator Indutor de Hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) e metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2). Os autores encontraram aumento da neoangiogênese nos espécimes dos animais tratados, quando comparados ao grupo Controle, 7 dias após irradiação. O Laser aumentou significativamente a expressão de VEGF e HIF-1 $\alpha$  nos grupos tratados, porém a expressão de MMP-2 mostrou-se menor, embora tais diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

A presente investigação foi a primeira a avaliar a neoangiogênese e a expressão de VEGF através de métodos imuno-histoquímicos, na fase de remodelamento do reparo tecidual. Observou-se que, neste período, a produção de VEGF se fez presente em ambos os grupos do estudo ( $p > 0,05$ ). Este achado não contradiz os dados da literatura descritos anteriormente, mas amplia a compreensão acerca do papel do VEGF, o qual parece ser mais determinante nos períodos iniciais do processo de cicatrização. De fato, demonstrou-se associação entre o número de células VEGF+ e os vasos sanguíneos nos dias contemplados neste estudo, para o grupo tratado, embora este dado não fosse estatisticamente significativo. Outros fatores de crescimento pró-angiogênicos cuja expressão estaria relacionada à fase tardia do reparo, tais como o FGF-2, CTGF e o TGF- $\beta$  devem ser pesquisados à luz da TLBP, a fim de que se possa avaliar a neoangiogênese de modo mais abrangente e determinar o seu papel como possível indutor de fibroplasia nas fases tardias da cicatrização.

## 5 CONCLUSÃO

A despeito do fato de que as ações primárias da TLBP sejam mais marcantes no período inicial do reparo, os achados deste trabalho de pesquisa sugerem fortemente que esta modalidade terapêutica foi capaz de interferir no curso tardio da cicatrização, particularmente no tocante à expressão do colágeno na matriz extracelular. No entanto, neste modelo experimental específico que analisou as alterações histopatológicas em tecido cutâneo, o processo de fibroplasia pareceu não estar diretamente relacionado à neoangiogênese, embora esta se fizesse presente em todos os períodos do estudo, em particular no grupo fotobiomodulado. De fato, a marcação com o anticorpo monoclonal anti-CD31, foi útil na avaliação do quantitativo de vasos neoformados, o qual apresentou-se significativamente maior no primeiro período do estudo correspondente ao grupo tratado.

No que diz respeito à presença de células VEGF+, os resultados indicam a necessidade de investigações adicionais que permitam a identificação *in situ* deste fator de crescimento, uma vez que a imunomarcação celular positiva não nos permite afirmar categoricamente que ele esteja atuando no microambiente da lesão. A literatura documenta a influência do VEGF principalmente nas fases iniciais do reparo, mas isto não exclui a possibilidade de que este possa modular a fibroplasia na fase de remodelamento tecidual, em especial como observado no presente estudo, no grupo de animais submetidos à TLBP.


## REFERÊNCIAS

1. Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of Low Energy Laser on the Growth and Regeneration of Capillaries. *Lasers in Medical Science* 1990; 5:381.
2. Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):616-23.
3. Loreti E H, Pascoal V L W, Nogueira B V, Silva I V, Pedrosa D F. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photom Laser Surg* 2015; 33: 104-116.
4. Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. *IEEE J Quan Elec* 1987;23(10):1703-1717.
5. Lemos QT, Andrade ZA. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(5): 611-614.
6. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Scie* 2013;72:206-17.
7. Rey S, Semenza G. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular Research* 2010;86, 236–242.
8. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobio B: Bio* 2008; 92: 144-52.
9. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms *The Journal of International Medical Research* 2009;37:1528-1542.
10. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003;32: 239-244.
11. Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Pinto Júnior DS, Mesquita-Ferrari RA. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photom Laser Surg* 2011;29: 11-17.
12. Martignago CCS, Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, Poli-Frederico R. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagens and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci* 2015;30: 203-208.
13. Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents


- fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):947-955.
14. Freitas CEA, Bertaglia RS, Vechetti Júnior IJ, Mareco EA, Salomão AS, de Paula TG, Nai GA, Carvalho RF, Pacagnelli FL, Dal-Pai-Silva M. High final energy of low-level gallium arsenide laser therapy enhances skeletal muscle recovery without a positive effect on collagen remodeling. *Photochem Photobio* 2015;91:957-965.
  15. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA & Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Brás* 2003;17(4): 307-13.
  16. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CAV, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquita-Ferrari RA. Modulating effect of low-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 2014;29: 813-821.
  17. Medrado A, Costa T, Prado T, Reis S, Andrade Z. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. *Photoderma Photoimmun Photomed* 2010;26:192-197.
  18. Kim SJ, Kang YG, Park JH, Kim EC, Park YG. Effects of low-intensity laser therapy on periodontal tissue remodeling during relapse and retention of orthodontically moved teeth. *Lasers Med Sci* 2013;28: 325-333.
  19. Merli LAS, Medeiros VP, Toma L, Reginato RD, Katchburian E, Nader HB, Faloppa F. The low level laser therapy effect on the remodeling bone extracellular matrix. 2012;88: 1293-1301.
  20. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in colagens remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *I Immunophar* 2004;4:1873-1880
  21. Pereira MC, 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. *J Photochem Photobio B: Bio* 2010;98: 188-192.
  22. Vasheghani MM, Bayat M, Rezaei F, Bayat A, Karimipour M. Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. *Photomed Laser Surg*. 2008;26:1-5.
  23. Bayat M, Vasheghani MM, Razavie N, Jalili MR. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. 2008;45(6): 931-938.
  24. Abe Y, Sakairi T, Beeson C, Kopp JB. TGF- $\beta$ 1 stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and generation of reactive oxygen species in cultured mouse podocytes, mediated in part by the mTOR pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305: 1477-1490

25. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 2011;26(3): 335-340.
26. Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TCY. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 2013;28: 725-734.
27. Guerra FDR, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, Aro AA, Pimentel ER. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci* 2013;28:1281-1288.
28. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5(1): 40–46.
29. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxiainitiated angiogenesis. *Nature* 1992;359: 843–845.
30. Delavary BM, Veer WM, Egmond M, Niessem FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair *Immunobiology* 2011;216: 753-762.
31. Andrade ZA. Double and paradoxical role for angiogenesis *Rev Patol Trop* 2013;42(3): 259-264.
32. Nienartowicz A, Sobaniec-Totowska ME, Jarocka-Cyrta E, Lemancewicz D. Mast cells in neoangiogenesis. *Med Sci Monit* 2006;12(3): 53-56.
33. Colombo F, Valença Neto AAP, de Souza APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRA. Effect of low-level laser therapy ( $\lambda$ 660nm) on angiogenesis in wound healing: an immunohistochemical study on a rodent model. *Braz Dent Journ* 2013;24(4):308-312.
34. Cury V, Moretti AIS, Assis L, Bossini P, Crusca JS, Benatti Neto C, Fangel R, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 $\alpha$  and MMP-2. *J Photochem Photobiol B Biol* 2013;125: 164–170.



**ANEXO****Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**

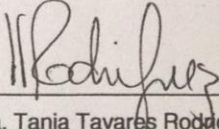
Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)  
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **0074/2015**, intitulado **“EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER DE 670 nm SOBRE A NEOANGIOGÊNESE DURANTE O REMODELAMENTO TECIDUAL”**, sob a responsabilidade do Professora Doutor Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado, lotada no setor de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **17 de abril de 2015**.

Salvador, 17 de abril de 2015.



Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez  
Coordenadora da CEUA-ICS  
Profª. Tânia Tavares Rodrigues  
Coordenadora da CEUA-ICS  
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

CEUA-ICS  
Av. Reitor Miguel Calmon S/N . Instituto de Ciências da Saúde . Vale da Canela CEP 40110-100 – Salvador – Bahia – Brasil .  
Telefone: 55-(71) 3283-8958 ou (71) 3245-0917 . E-mail: [ceuaiscs@ufba.br](mailto:ceuaiscs@ufba.br)

Telefone: (71) 3283-8958