



Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Saúde  
Mestrado em Saúde Brasileira  
Núcleo de Pesquisa em Imunopatologia e Imunologia Clínica

Karine Helena de Souza Lopes

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE E DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CIRÚRGICAS CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR:  
AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Juiz de Fora - MG  
2012

Karine Helena de Souza Lopes

**Estudo comparativo dos efeitos do laser de baixa intensidade e do ultrassom terapêutico no reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos Wistar: avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de Concentração em Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião V. Aarestrup

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Juiz de Fora  
2012

Karine Helena de Souza Lopes

**Estudo comparativo dos efeitos do laser de baixa intensidade e do ultrassom terapêutico no reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos Wistar: avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de Concentração em Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovada em 27/ 08 /2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra  
Universidade Federal de Ouro Preto

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Christina Marques Nogueira Castañon  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte de luz, sabedoria e inspiração.

À minha mãe, pelo apoio incondicional. Por todo investimento emocional e financeiro em minha educação e formação profissional.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz J. V. Aarestrup por acreditar em mim e por tornar a realização dessa pesquisa possível. Obrigada pelo incentivo, paciência, dedicação e carinho durante a orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando M. Aarestrup. Exemplo de profissional, mostrando que é possível fazer pesquisa em nossa realidade.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Imunopatologia e Imunologia Clínica, pela colaboração.

À Ana Cristina pelo apoio durante o experimento prático.

Ao meu Coordenador Adeir Rocha Júnior. Grande incentivador deste projeto.

Aos amigos da clínica pelo apoio logístico e operacional.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O laser de baixa intensidade e o ultrassom terapêutico têm se mostrado opções para modulação da cicatrização, porém, os mecanismos de ação destas técnicas não são bem esclarecidos. Para avaliar os efeitos da laserterapia e do ultrassom terapêutico em feridas cutâneas cirúrgicas em ratos Wistar (n=24), foram utilizados quatro grupos: I (controle), II (LLLT), III (ultrassom) e IV (laserterapia e ultrassom). No décimo dia, as lesões foram fotografadas e medidas e, após removidas excisionalmente no momento da eutanásia, foram processadas para avaliação histopatológica para avaliação da densidade e organização das fibras colágenas; avaliação histomorfométrica para quantificação da angiogênese e infiltrado inflamatório; e imunistoquímica, para expressão de TGF $\beta_1$ . As amostras dos grupos tratados exibiram aspecto macroscópico mais maduro em relação ao grupo não tratado, sem diferença significativa no fechamento das lesões; microscopicamente, os resultados sugeriram que a laserterapia exerceu melhor efeito imunomodulador quando utilizado isoladamente e que o ultrassom terapêutico mostrou maior potencial angiogênico. A avaliação imunistoquímica revelou que a maioria das células inflamatórias na área cicatricial não expressava TGF $\beta_1$ . Ainda, embora a laserterapia e a aplicação do ultrassom atuem diretamente na redução do infiltrado, as terapias concomitantes não potencializam o efeito observado quando aplicadas isoladamente; apesar do tempo de fechamento das feridas não ter sido influenciado pelas terapias isoladas ou associadas, todos os tratamentos favoreceram a organização da matriz extracelular colagenosa. A LLLT isoladamente e a combinação de ambas as técnicas possibilitaram a reepitelização das feridas submetidas a estas modalidades terapêuticas. A maioria das células que migraram ou entraram em proliferação na área cicatricial não expressavam o TGF $\beta_1$ , sugerindo que o controle do infiltrado inflamatório exercido pela LLLT e pelo UST não é modulado por esta citocina.

Palavras-chave: Cicatrização. Inflamação. LLLT. Ultrassom terapêutico. TGF $\beta$ .

## ABSTRACT

Low level laser therapy (LLLT) and therapeutic ultrasound have been demonstrated to be options for healing modulation, but the mechanisms of action involved in these processes are not clear. The effects of laser therapy and therapeutic ultrasound on surgical skin wounds in Wistar rats (n=24) were evaluated using four groups: I (control), II (LLLT), III (ultrasound) and IV (laser therapy and ultrasound). On the tenth day, the wounds were photographed and measured, and after excision at the moment of euthanasia, they were processed for histopathological evaluation to assess the density and organization of collagen fibers. In addition, histomorphometric evaluations were conducted to quantify angiogenesis and inflammatory infiltrates, and immunohistochemistry was performed to assess TGF $\beta_1$  expression. The samples from the treated group had a more mature macroscopic appearance compared to the untreated group, with no significant difference in wound closure. Microscopically, the results suggested that the laser therapy had a better immunomodulatory effect when used alone and that the therapeutic ultrasound showed a higher angiogenic potential. The immunohistochemical evaluation revealed that most of the inflammatory cells in the scar area did not express TGF $\beta_1$ . Still, although the application of laser therapy and ultrasound act directly in the reduction of infiltration, the concomitant therapies do not potentiate the effect observed when applied in isolation, despite the time of wound closure was not influenced by therapy alone or associated, all treatments favored collagenous extracellular matrix organization. The LLLT alone and the combination of both techniques allowed the re-epithelialization of wounds under these treatment modalities. The majority of cells that migrated in the proliferation or entered in the cicatricial area is not expressed TGF $\beta_1$ , suggesting that the control exercised by the inflammatory infiltrate and the LLLT UST is not modulated by this cytokine.

Keywords: Repair. Skin wound. Laser therapy. Therapeutic ultrasound. Transforming growth factor- $\beta$ .

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GaAlAs	Gálio-alumínio-arsênico
HeNe	Hélio-neon
Hz	Hertz
IFN-γ	Interferon gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LLLT	Terapia a laser de baixa intensidade
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
mg/Kg	Miligrama por quilo de peso
MHz	Megahertz
min	Minutos
MIPs	Proteínas inflamatórias para macrófagos
mW	Miliwatts
NK	Natural Killers
nm	Nanômetro (comprimento de onda)
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator ativador plaquetário
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
s	Segundos
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de crescimento transformador-beta
Th1	Linfócito CD4 ou helper 1

Th2	Linfócito CD4 ou helper 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
US	Ultrassom
UST	Ultrassom terapêutico
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
W/cm <sup>2</sup>	Watts por centímetro quadrado
x	Vezes
$\mu$ L	Microlitro



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1.História natural do processo cicatricial.....	10
1.2. Células e citocinas inflamatórias na cicatrização.....	16
1.3. Recursos físicos.....	20
1.3.1 Terapia a laser de baixa intensidade.....	21
1.3.2 Ultrassom terapêutico.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1.Objetivo geral.....	26
2.2.Objetivos específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Animais de experimentação.....	27
3.2. Procedimento cirúrgico.....	27
3.3. Tratamentos.....	28
3.3.1. Protocolo de laserterapia.....	29
3.3.2. Protocolo de aplicação do ultrassom terapêutico.....	29
3.4. Evolução macroscópica da ferida.....	30
3.5. Obtenção das amostras cutâneas.....	31
3.6 Análise histopatológica e histomorfométrica .....	31
3.7. Análise imunoistoquímica.....	32
3.8. Análise estatística.....	33
3.9 Comitê de ética.....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	36
REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE 1 .....	45
APÊNDICE 2 .....	64

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRIA NATURAL DO PROCESSO CICATRICIAL

A função básica do sistema tegumentar – pele e anexos epidérmicos – é formar uma barreira protetora contra o ambiente externo, além de participar da termorregulação, do metabolismo e do armazenamento de vitaminas e de lipídeos; ainda, é um importante órgão sensorial, captando estímulos contínuos do meio como tato, temperatura e dor (COELHO et al., 1999; GARTNER et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2008; AARESTRUP, 2012).

A pele é composta por uma camada externa denominada epiderme e uma mais profunda, a derme. A epiderme possui origem embrionária ectodérmica, caracterizada por tecido epitelial de revestimento pavimentoso estratificado queratinizado, com a espessura da camada de queratina variável conforme o atrito mecânico nas diversas regiões anatômicas (GARTNER et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2008; ROCHA, 2009; AARESTRUP, 2012).

Na epiderme, as camadas de células epiteliais contíguas são firmemente aderidas, com pouco espaço intercelular e pouca matriz extracelular, estando separadas da derme por uma matriz extracelular especializada, a lâmina basal, responsável pela nutrição e oxigenação do epitélio, pois este é avascular, a despeito de ser bastante innervado (GARTNER et al., 2007; AARESTRUP, 2012).

Ainda, o epitélio de revestimento pavimentoso estratificado queratinizado encontra-se, histologicamente, disposto nas camadas a seguir, do estrato mais profundo até o mais superficial (GARTNER et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2008; ROCHA, 2009; AARESTRUP, 2012):

- Camada germinativa ou basal: separa as demais camadas da epiderme, da derme. É chamada germinativa por possuir células-tronco do adulto, responsáveis, juntamente com a porção mais superficial da camada espinhosa, pela renovação epidérmica. Estas células recebem a denominação de lábeis, ou seja, são altamente renováveis e passíveis de reparo por regeneração. Sugere-se que a renovação completa das camadas ocorra em intervalos de 15 a 30 dias. Outro aspecto de destaque é a proximidade desta camada com a derme papilar, rica em vasos, visto

que se trata de camada de alto metabolismo, com mitose constante e, conseqüentemente, grande necessidade de nutrientes;

- Camada espinhosa: é a mais espessa da epiderme, formada por células cubóides, mitoticamente ativas, cujos citoplasmas possuem feixes de filamentos de queratina, os tonofilamentos, que possibilitam a união entre células vizinhas através dos desmossomos;

- Camada granulosa: constituída por células pavimentosas com núcleo central achatado e citoplasma com grânulos basófilos. Com a diferenciação e amadurecimento celular, os conteúdos destes grânulos são liberados após desintegração dos núcleos, formando lâminas de uma substância rica em lipídeos, responsáveis por formar uma barreira contra penetração de substâncias e tornar a pele impermeável à água, não permitindo a desidratação;

- Camada lúcida: está presente somente na epiderme de pele espessa, é constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinofílicas, translúcidas, na qual enzimas lisossômicas digerem o núcleo e as organelas citoplasmáticas. As fibrilas de queratina e algumas gotículas de eleidina (produto da transformação da querato-hialina) permanecem íntegras, sendo que estas gotículas se transformam em queratina e passam a fazer parte da camada córnea.

- Camada córnea: é constituída por várias camadas, com espessura variável, de células em apoptose, achatadas e anucleadas, cujos citoplasmas foram preenchidos gradualmente por uma proteína fibrosa chamada queratina. Estas células são denominadas queratinócitos e compõem estruturalmente as camadas epiteliais sintetizando a proteína queratina.

Além dos queratinócitos, a epiderme contém outros três tipos celulares: melanócitos - produzem a proteína melanina, responsável não só pela pigmentação da pele, como também pela proteção através da formação de um filtro à radiação ultravioleta; as células de Langerhans - são apresentadoras de antígenos, fazendo parte do sistema imunitário; e as células de Merkel - dispersas entre as células da camada basal, são consideradas como mecanorreceptoras, porém esta classificação não é universalmente aceita. Sugere-se que estas células apresentam alguma atividade neuroendócrina (JUNQUEIRA et al., 2008; GARTNER et al., 2007; AARESTRUP, 2012).

A derme, derivada do mesoderma, é constituída por tecido conjuntivo propriamente dito. Possui elementos celulares e matriz extracelular contendo

substância fundamental amorfa e proteínas fibrosas de colágeno Tipo I, fibras reticulares e fibras elásticas. A derme é subdividida em camada papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizada e innervada, e camada reticular, preenchida por tecido conjuntivo denso não modelado, mais fibrosa, contendo a maioria dos anexos da pele. Em profundidade encontramos a hipoderme, composta por tecido conjuntivo frouxo rico em tecido adiposo, que compõe a fáscia superficial, não pertencendo à pele (Figura 1).

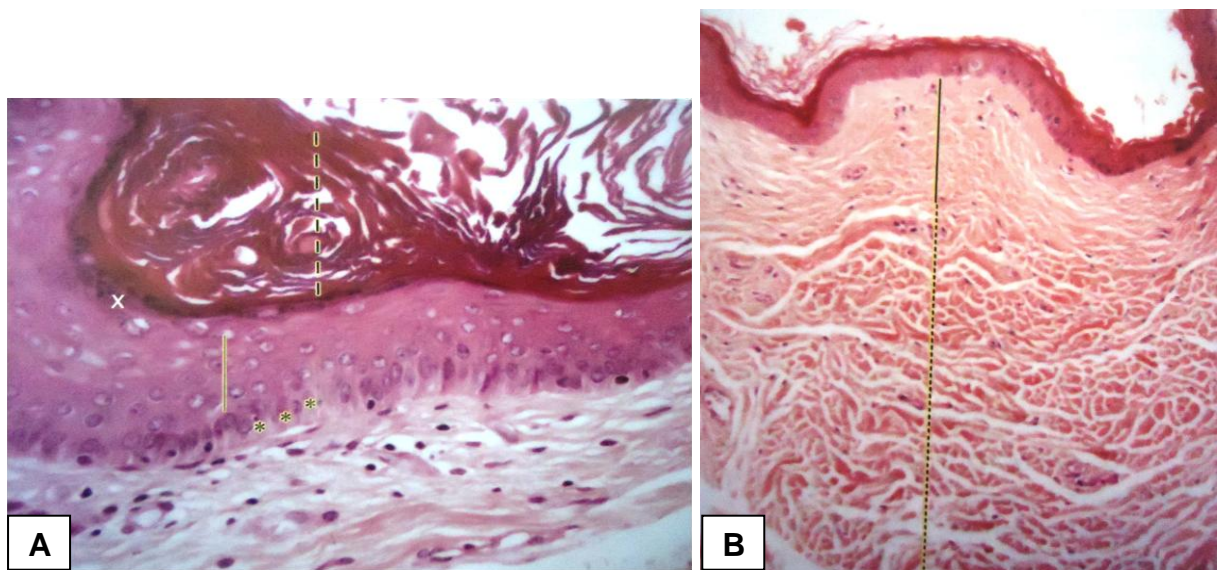


Figura 1: (A) Epiderme. Camada basal (asteriscos). Camada espinhosa (barra). Camada granulosa (X). Camada córnea (linha pontilhada). (B) Derme. Derme papilar (barra). Derme reticular (linha pontilhada). AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 393-396.

A pele está frequentemente exposta a alterações do meio e a agressões, sejam físicas, químicas ou mecânicas, que desencadeiam interrupção da continuidade do tecido (COELHO et al., 1999). A cicatrização é um evento complexo que ocorre em uma tentativa de restaurar a integridade anatômica e funcional de um tecido que sofreu alguma lesão (MEDRADO et al., 2003; REDDY, 2004; SNYDER, 2005; CARVALHO et al., 2006). Lesões nesse tecido levam a perda funcional local e, de acordo com a causa e extensão, a consequências e reações sistêmicas. Vários fatores contribuem para criação de diversos tipos de cicatrização, um deles é o tipo de ferida (TANAKA et al., 2004). Assim, o tempo de fechamento das feridas vem sendo estudado, bem como mecanismos que modulam a cicatrização são alvos de pesquisas.

Independente do tipo de ferida, o reparo tecidual tem sua história natural dividida em cinco fases, com limites não distintos, mas que ocorrem numa sobreposição temporal: hemostasia; inflamação; demolição; proliferação e maturação, conforme observamos na *Figura 2* (DIEGELMANN et al., 2004; KUMAR et al., 2005; REINKE et al., 2012).

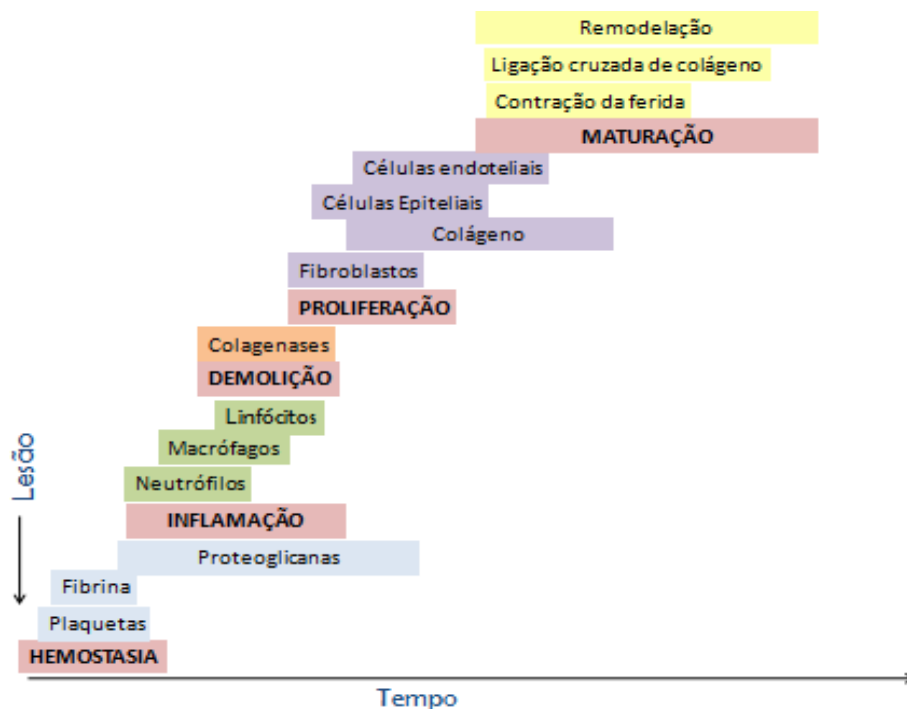


Figura 2: Sequência de eventos durante a cicatrização normal. Adaptado de DIEGELMANN et al. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 283-289, 2004.

A fase da hemostasia inicia-se imediatamente após a lesão e depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (EMING et al., 2007). A lesão endotelial dá início a uma sequência de eventos que começa com a deposição plaquetária, seguida por ativação e recrutamento de novas plaquetas, resultando em formação de coágulo. Este tampão inicial rico em plaquetas que se forma sobre a lesão endotelial é posteriormente infiltrado pela fibrina e será responsável pelo vedamento da lesão vascular (DIEGELMANN et al., 2004). Esse coágulo fibrinoso servirá de alicerce às células sanguíneas que desencadearão a próxima fase do reparo (MENDONÇA et al., 2009). As plaquetas ativadas liberam mediadores como o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tromboxanos e o fator ativador plaquetário (PAF) que se difundem

pela matriz provisória, formando gradiente quimiotático de orientação para migração dos leucócitos diretamente associados à resposta inflamatória (REINKE et al., 2012).

Ainda inicialmente, a liberação de mediadores químicos por elementos celulares presentes no coágulo desencadeia uma reação inflamatória aguda, com objetivo de remover partículas inertes, bactérias e os restos celulares (RIBEIRO et al., 2009).

Sequencialmente à hemostasia ocorre fibroplasia associada à atividade fagocitária e liberação de fatores de crescimento, resultando em deposição de nova matriz extracelular e na formação de tecido de granulação. Este tecido cicatricial jovem exibe intensa proliferação de componentes vasculares essenciais para o fornecimento de oxigênio e maior disponibilidade de nutrientes necessários para a cicatrização (WERNER et al., 2003). Juntamente com a angiogênese surgem fibroblastos - estas células jovens sofrem a ação de fatores de crescimento específicos, como o TGF- $\beta$  e o FGF (fator de crescimento fibroblástico) (PROFYRIS et al., 2012; ZHONG et al., 2012). Após intensa atividade mitótica e diferenciação, fibroblastos sintetizam elementos básicos para a formação da matriz: proteínas colágeno, reticulina e elastina, glicosaminoglicanas, glicoproteínas multiadesivas e proteases (enzimas responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico) (REINKE et al., 2012).

Destaca-se que durante a fase de proliferação ocorre diferenciação de miofibroblastos, células com características morfológicas e ultra-estruturais mistas de fibra muscular lisa e fibroblasto, possuindo, assim, a capacidade de se contraírem, realizando movimento centrípeto das bordas da ferida (HINZ, 2007; LI et al., 2009).

Paralelamente à fibroplasia, há formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, a neovascularização da região, essencial neste estágio para permitir a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas. O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) é o principal regulador da angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial. Estudo utilizando suínos (n=15) submetidos à lesão cirúrgica na parede abdominal demonstrou que a neutralização de VEGF por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o edema em regiões que sofreram lesão (HOWDIESHELL et al., 2001).

Além do VEGF, angiopoetinas são uma segunda família de fatores de crescimento vascular que atuam sobre o endotélio; porém, ao contrário do VEGF, as angiopoetinas não regulam a proliferação endotelial, mas são responsáveis pelo amadurecimento dos vasos sanguíneos como um todo, especialmente a

angiopoietina-1 (WERNER et al., 2003). Outros mediadores relacionados à angiogênese como o FGF, produzido pelos próprios fibroblastos e por células endoteliais com ação mitótica, e o TGF- $\beta$  participam do processo. Na angiogênese, o TGF- $\beta$  participa do remodelamento vascular em situações de estresse oxidativo (WERNER et al., 2003; RANGANATHAN et al., 2007). Os capilares neoformados, ainda imaturos, possuem grande permeabilidade, levando ao edema do tecido de granulação (HATANAKA et al., 2007).

Os queratinócitos são as células mais abundantes no epitélio, conferem a resistência da pele aos agravos físicos e químicos e permeabilidade à água (FERREIRA et al., 2009). Durante a fase de reepitelização, os queratinócitos não danificados migram do bordo da ferida, por influência de fatores de crescimento específicos - EGF (fator de crescimento epidérmico), KGF (fator de crescimento de queratinócitos), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1); integrinas e metaloproteases, e são os responsáveis pelo aumento de mitose e hiperplasia compensatória do revestimento epitelial (REINKE et al., 2012; MENDONÇA et al., 2009).

Ao final da reepitelização, proliferação celular fibroblástica e angiogênese, o tecido conjuntivo da derme sofre maturação, com reorganização das fibras conjuntivas e restabelecimento da vascularização, além de apoptose de miofibroblastos e células inflamatórias (PROFYRIS et al., 2012; MENDONÇA et al., 2009). Finalmente, o restabelecimento funcional é atingido com liberação de proteases que degradam o excesso de colágeno depositado (HENEMYRE-HARRIS et al., 2008; HUNT et al., 2000).

A evolução destas diversas fases do reparo é direta ou indiretamente influenciada pelos componentes inflamatórios celulares. Alguns fatores locais e sistêmicos - tipo, tamanho e localização da lesão, movimentação local, vascularização, infecção, alteração metabólica, nutricional e imunológica também podem influenciar o reparo, tornando-o mais lento ou levando a complicações (ROCHA JÚNIOR et al., 2007). A reação inflamatória também é necessária para que haja a remoção de partículas inertes, bactérias e os restos celulares da área lesionada. Porém, destaca-se que a persistência do infiltrado é uma das principais razões para o atraso na cicatrização ou surgimento de lesões secundárias (PROFYRIS et al., 2012).

Diante destas variáveis do processo de reparo tecidual, pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de se desenvolver novos recursos para modular os mecanismos biológicos envolvidos na cicatrização (GUNTER et al., 2012).

O conhecimento dos componentes celulares e moleculares que participam do processo é fundamental para que tal modulação seja eficaz (WERNER et al., 2003).

## **1.2 CÉLULAS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA CICATRIZAÇÃO**

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se compreender a influência da intensidade do infiltrado inflamatório, seus componentes celulares e citocinas no reparo tecidual (GILLITZER et al., 2001; WERNER et al., 2003; EMING et al., 2007; SCHULTZ et al., 2009; BRANCATO et al., 2011).

Entre as principais células presentes no sítio da reação inflamatória destacam-se os neutrófilos, os macrófagos e os linfócitos (McANULTY, 2007).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa imunológica inata. Estes leucócitos exibem metabolismo intenso e meia vida curta, assim como dos demais polimorfonucleares - aproximadamente 24 a 72 horas. Seus grânulos citoplasmáticos contêm lisozima (bactericida), lactoferrina (bacteriostática), radicais livres de oxigênio, óxido nítrico, água oxigenada, ácidos e enzimas lisossômicas, as quais são utilizadas conforme a necessidade, em conjunto ou isoladas. Como primeira linha de defesa, a transmigração destas células para a área da lesão é um fenômeno precoce do processo inflamatório e, conseqüentemente, do reparo e ocorre a partir da liberação de fatores quimiotáticos como o PDGF, dentre outros (GARTNER et al., 2007).

Após processo de transmigração, os neutrófilos fagocitam pequenas partículas inertes e restos celulares, assim como bactérias que permeiam o ambiente da lesão (HACKAM et al., 2002; REINKE et al., 2012). Posteriormente, e proporcionalmente à fagocitose, há liberação de fatores de crescimento - glicoproteínas indutoras do processo cicatricial, com o objetivo de repor compensatoriamente a área lesada. Se, após o tempo de vida útil do neutrófilo, houver persistência da lesão ou presença de microrganismos, a membrana celular neutrofílica libera lipoxinas durante o processo apoptótico - glicoproteínas quimiotáticas para leucócitos mononucleares, que vivem



mais e exibem maior potencial fagocitário ou imunológico adquirido. Esta mudança de perfil celular tecidual de polimorfonucleares para mononucleares, após aproximadamente 72 horas de evolução da inflamação, caracteriza a passagem da inflamação aguda para a crônica (KUMAR et al., 2005).

A partir do momento em que os monócitos realizam diapedese em direção à área da lesão, se diferenciam em macrófagos, aumentando a população de células mononucleares residentes no tecido conjuntivo (EMING et al., 2007). As proteínas inflamatórias para macrófagos (MIPs) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) são responsáveis por este aumento da celularidade. Após transmigração, estas células são ativadas sofrendo hipertrofia e aumento metabólico, passando a desempenhar várias funções imunológicas como fagocitose, apresentação de antígenos e liberação de fatores de crescimento, como TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , FGF, PDGF, VEGF (HATANAKA et al., 2007; GILLITZER et al., 2001; EMING et al., 2007; SANTIBAÑEZ et al., 2011).

O macrófago é uma célula extremamente relevante na fase da inflamação, pois além de exercer intensamente a fagocitose de partículas maiores, restos celulares mais complexos e eventuais microrganismos, estimulam o desenvolvimento de tecido de granulação, através da produção e exportação de mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações do complemento e fatores de coagulação) e enzimas relacionadas ao reparo (tais como colagenases e metaloproteinases) (SINGER et al., 1999; RODERO et al., 2010; BRANCATO et al., 2011).

O infiltrado mononuclear é composto também por linfócitos que, via produção de linfocinas e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), tem importante influência sobre a quimiotaxia e ativação de macrófagos, respectivamente (RODERO et al., 2010).

Os linfócitos são divididos em três populações funcionais: linfócitos T, linfócitos B e células NK, sendo que linfócitos T e B fazem parte da resposta imunológica adquirida. Os linfócitos T coordenam a resposta imunológica celular e desenvolvem a capacidade de reconhecimento antigênico no timo, órgão no qual também ocorre o processo de surgimento dos grupos de diferenciação T CD4 (linfócitos auxiliares ou T helpers) e T CD8 (linfócitos regulatórios) (ZHU et al., 2010).

Na resposta celular, os linfócitos T controlam - seja estimulando ou inibindo - a atividade de outras células como monócitos, macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos B, responsáveis pela resposta imunológica humoral, permanecem na medula óssea,

onde se dá seu amadurecimento (COTRAN et al., 2001). Destaca-se ainda, que os linfócitos TCD4 se diferenciam conforme o padrão de produção de citocinas em várias linhagens de T helper (Th), sendo a Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias (iTreg) as mais estudadas. A resposta Th1 está associada à resposta imunológica pró-inflamatória, presente em danos teciduais. Em contrapartida, a resposta Th2 auxilia a síntese de anticorpos por plasmócitos e ativação de eosinófilos, além de participar da resposta cicatricial e processos fibróticos (HINORUBU, 2002; SANDLER et al., 2003; ZHU et al., 2010).

A diferenciação dos linfócitos TCD4 em células Th17 se dá na presença de TGF- $\beta_1$  e IL-6 (interleucina-6) e passam a produzir as citocinas IL-17 (interleucina-17) e IL-22 (interleucina-22), enquanto as células iTreg são ativadas por TGF- $\beta_1$  e IL-2 (interleucina-2) tendo a função de suprimir as respostas Th1 e Th2 (ZHU et al., 2010).

As citocinas presentes no sítio inflamatório são importantes no estímulo e na evolução do processo cicatricial, pois participam da ativação de células endoteliais e da expressão de moléculas de adesão, contribuindo, assim, para o recrutamento e acúmulo de células fagocitárias para área lesada. Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias estão a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (HATANAKA et al., 2007).

A IL-1, produzida por macrófagos e por queratinócitos, modula positivamente moléculas de adesão e ativa metabolicamente os neutrófilos, ainda, é responsável pela mitose e diferenciação de queratinócitos e estimula a produção de colágeno precocemente no processo de reparo. A IL-6 é produzida tanto por neutrófilos e macrófagos como por fibroblastos, sendo um potente estimulador mitótico deste último (LUCKETT-CHASTAIN et al., 2009). O TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos, está envolvido na regulação de moléculas de adesão e segundo Hackam et al. (2002) potencializam a migração de queratinócitos (HACKAM et al., 2002; WERNER et al., 2003; HATANAKA et al., 2007; PROFYRIS et al., 2012). Estas citocinas estimulam receptores endoteliais que induzem a produção de óxido nítrico (NO) - gás produzido em resposta a diversos estímulos inflamatórios por macrófagos, linfócitos TCD4, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, células ósseas e condrócitos, a partir da L-Arginina por ação de enzimas denominadas de um modo em geral NO sintases (NOS) (HIROSE et al., 2001). Em níveis fisiológicos o NO participa da modulação da resposta imunológica, porém, em concentrações elevadas pode agir

como uma molécula citotóxica levando a lesões secundárias nas áreas inflamadas (BATISTA et al., 2002; SUSCHEK et al., 2004; ZOCHODNE et al., 2005).

Destacam-se, ainda, como importantes fatores de crescimento, o PDGF e o TGF- $\beta$  (PROFYRIS et al., 2012).

O PDGF é liberado em grandes quantidades a partir da degranulação das plaquetas, imediatamente após a lesão tecidual. Foi o primeiro fator de crescimento cuja propriedade quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos foi demonstrada. Ainda, estimula a produção de matriz extracelular e síntese de colágeno por meio da proliferação de fibroblastos e, também, a diferenciação de miofibroblastos (WERNER et al., 2003; PROFYRIS et al., 2012).

O TGF- $\beta$  é uma citocina liberada imediatamente após a lesão, por plaquetas, e posteriormente por macrófagos e queratinócitos, e está envolvido de maneiras diferentes em todas as etapas do processo cicatricial. Dentre suas atividades gerais estão a quimiotaxia para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, a indução de angiogênese, estímulo à fibrose e à reepitelização (WANG et al., 2006; NISHIMURA, 2009; LUCKETT-CHASTAIN et al., 2009; YOON et al., 2010; SANTIBAÑEZ et al., 2011). Ainda, estudos demonstram que o TGF- $\beta$  é um potente estimulador da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990; MASSAGUÉ, 1998; ROBERTS et al., 1996).

O TGF- $\beta$  possui as isoformas TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e TGF- $\beta_3$ , sendo que esta última é considerada por Shah et al. (1995) antagonista das demais (SHAH et al., 1995; WERNER et al., 2003; SANTIBAÑEZ et al., 2011). O TGF- $\beta_1$  parece ser a isoforma com maior espectro de ação (LUCKETT-CHASTAIN et al., 2009).

Estudo realizado por Ashcroft et al. (1999) com ratos *Knockout Smad3* (em que a sinalização para TGF- $\beta$  é parcialmente abolida) evidenciou acelerada cicatrização, caracterizada por redução de monócitos no infiltrado inflamatório e maior proliferação de queratinócitos em comparação com ratos selvagens (ASHCROFT et al., 1999; WANG et al., 2006; MAUVIEL, 2009).

Shah et al. (1994), em experimentos com feridas cutâneas de camundongos tratadas com anticorpos neutralizantes de TGF- $\beta_1$  injetados no local da lesão, observaram que houve uma redução significativa na deposição de matriz extracelular e à subsequente cicatrização (SHAH et al., 1994; SHAH et al., 1995; SHAH et al., 1999).

O efeito do TGF- $\beta_1$  na reepitelização é aparentemente paradoxal. Pesquisas *in vivo* como *in vitro*, demonstram que esta isoforma inibe a proliferação de queratinócitos, o que sugere ação reguladora negativa da reepitelização; por outro lado, diversos resultados sugerem indução da expressão da integrina, fundamental para a migração de queratinócitos sobre a matriz provisória rica em fibronectina (MAUVIEL, 2009; MARGADANT et al., 2010).

Estudo realizado por Yang et al. (2001), utilizando camundongos transgênicos que expressam o transgene TGF- $\beta_1$  em queratinócitos apresentaram atraso na cicatrização após ferimento de queimadura provocadas com laser de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, Amendt et al. (2002), idealizaram um experimento com camundongos transgênicos expressando o receptor dominante negativo de TGF- $\beta$  exclusivamente nos queratinócitos e evidenciaram uma acelerada reepitelização em feridas de pele.

Ainda, segundo Adzick et al. (1994), moléculas da superfamília TGF- $\beta$  estão diretamente relacionadas à qualidade do tecido cicatricial formado. Estudos demonstram que a diminuição da expressão desta citocina dificulta o fechamento da lesão, por interferir no aumento da população de células como macrófagos e fibroblastos e, também, na angiogênese. Em contrapartida, o excesso de TGF- $\beta$  pode levar a formação de fibrose, pois haverá um estímulo excessivo do metabolismo de fibroblastos com produção exagerada de matriz extracelular (ADZICK et al., 1994).

### 1.3 RECURSOS FÍSICOS

Diante da necessidade clínica de se modular o processo de reparo, recursos físicos auxiliares vêm sendo propostos. Essas técnicas visam à modulação do sistema imunológico e das reações inflamatórias (DE OLIVEIRA et al., 2010). O potencial destas técnicas tem sido alvo de diversos trabalhos e, apesar de seu resultado clínico final ser positivo, o mecanismo de ação local e sua influência sistêmica ainda não foram esclarecidos (ROCHA JÚNIOR et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2007; ROCHA JÚNIOR et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2010).

Dentre os recursos disponíveis para o auxílio à evolução cicatricial, a utilização de terapias adjuvantes, como a terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) e o

ultrassom terapêutico (UST), tem se mostrado de fundamental importância para o estímulo de determinados mecanismos fisiopatológicos, da manutenção da estrutura celular e para melhor qualidade do tecido neoformado (DEMIR et al., 2004; ALTOMARE et al., 2009; WOOD et al., 2010).

### **1.3.1 TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE (*LOW LEVEL LASER THERAPY*) – LLLT**

A sigla L.A.S.E.R tem origem na língua inglesa, abreviando "*light amplification by stimulated emission of radiation*", já a palavra laser é consagrada pelo uso e define fonte de luz monocromática, intensa, coerente e colimada, cuja emissão de radiação se faz pelo estímulo de campo externo (INOE et al., 2008).

Baseado na intensidade o LASER pode ser classificado como de alta potência (com potencial destrutivo, ultrapassando o limiar de sobrevivência da célula), como utilizado em cirurgias ou em remoção de cáries e em baixa potência (sem potencial destrutivo, induzindo a biomodulação celular), neste caso é chamado de laserterapia ou terapia a laser de baixa intensidade (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Endre Mester, em 1968, foi o primeiro a relatar a aplicação clínica do LLLT na cicatrização de úlceras crônicas (REDDY, 2004). O uso da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) para auxiliar a cicatrização de feridas faz parte da realidade clínica há algumas décadas, tornando-se um recurso de grande utilidade neste tipo de tratamento, principalmente pela sua fácil aplicação (SOBANKO et al., 2008).

A LLLT possui propriedade fotofísicoquímica, na qual a luz do laser interage a nível biomolecular, por meio dos processos bioelétricos, bioenergéticos e bioquímicos celulares, promovendo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de aceleração da cicatrização de feridas, atribuídas ao estímulo de vários sistemas biológicos, como aumento da proliferação e atividade celular, aumento da síntese de DNA, modulação da produção dos fatores de crescimento e redução na produção de prostaglandinas (DAMANTE et al., 2008; PINTO et al., 2009).

Em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório vem sendo investigada a evolução do processo de reparo em feridas cutâneas associada à laserterapia (ROCHA JÚNIOR et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2007; ROCHA JÚNIOR et al.,

2009; DE OLIVEIRA et al., 2010). Em um destes trabalhos publicados foram provocadas feridas cutâneas na região dorsal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), submetidos ao tratamento com laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de 780 nm, dosagem de 3,8 J/cm<sup>2</sup>, 15 mW de potência e tempo de aplicação de 15 segundos. Os animais (n = 12) foram divididos em dois grupos, um controle e outro tratado com laser, sendo realizadas, no grupo tratado, três aplicações (imediatamente após o ato cirúrgico, 48 horas e sete dias após a realização das feridas cirúrgicas). No décimo dia os animais foram eutanasiados. Os resultados evidenciaram aumento da neovascularização e da proliferação fibroblástica e diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório nas lesões cirúrgicas submetidas à terapia com laser. Estes resultados em conjunto sugerem que a terapia a laser de baixa intensidade é um método eficaz no processo de modulação do reparo tecidual, contribuindo significativamente para uma cicatrização mais rápida e organizada (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Em outro estudo também utilizando a LLLT como tratamento em feridas cutâneas em modelo experimental em ratos Wistar, foi demonstrado níveis elevados de TGF- $\beta_2$  no grupo tratado em relação ao grupo controle, ou seja, houve redução da resposta inflamatória e indução de regeneração tecidual, em contrapartida a terapia é importante indutora de apoptose em células epiteliais durante o processo de reparo (ROCHA JÚNIOR et al., 2009).

Bayat et al. (2009) realizaram estudo para avaliar os efeitos do laser GaAlAs na cicatrização de feridas abertas cirurgicamente induzidas em ratos, utilizando comprimento de onda de 780 nm, dosagem de 2 J/cm<sup>2</sup> e frequência de 2336 Hz e foi constatado aumento de fibroblastos, vasos sanguíneos e da resistência tênsil, além da diminuição de macrófagos, comparado ao grupo controle.

Outro estudo evidenciou que a terapia a laser pode influenciar o processo cicatricial, por meio da promoção do aumento da atividade mitótica e da liberação de fatores de crescimento, induzindo uma resposta inflamatória mais rápida. Foi demonstrado, também, maior número de fibroblastos e melhor organização das fibras colágenas dispostas em paralelo. As feridas tratadas com LLLT apresentaram um aspecto mais maduro comparadas com o grupo controle (GONÇALVES et al., 2007).

Ainda sobre os efeitos do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas foi avaliado em modelo experimental com 70 ratos Wistar, divididos em grupo controle e grupo tratado. Utilizou-se ferida incisional, longitudinal, dorso-

mediana, suturada com pontos simples. No grupo tratado, as feridas foram irradiadas diariamente com aparelho de laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8 nm, energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, durante 12 s, em três pontos da lesão. Foi realizada imunohistoquímica com anti-CD45-LCA para reconhecimento das células inflamatórias e avaliação histoquímica com coloração Picrosirius para identificar os colágenos I e III. Os resultados do estudo sugerem que o LLLT não modifica a qualidade da reação inflamatória, mas diminui sua intensidade e aumenta a deposição do colágeno no início do processo cicatricial, não interferindo na maturação da cicatriz (BUSNARDO et al., 2010).

### **1.3.2 ULTRASSOM TERAPÊUTICO – UST**

O ultrassom (US), por definição, é produzido por ondas sonoras com frequências acima de 20.000 Hz. Um arranjo sequencial de cristais piezelétricos (quartzo), contidos nos transdutores, produz ultrassom a partir de energia elétrica (HELAYEL et al., 2007). A energia sonora ao ser transmitida aos tecidos biológicos é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos (OLSSON et al., 2008). O US pode ser utilizado para realização de diagnóstico por imagem – frequência de 2 a 20 MHz ou terapêuticamente – frequência de 1 e 3 MHz (HELAYEL et al., 2007; OLSSON et al., 2008). Para impedir a reflexão das ondas sonoras são utilizados agentes para acoplar o transdutor à pele. Os meios de condução mais comuns são gel à base de água ou imersão em água (CASAROTTO et al., 2004).

O ultrassom terapêutico vem sendo pesquisado quanto ao seu potencial auxílio à cicatrização. Há relatos sobre os efeitos no processo de cicatrização dos ossos, tendões, músculos, ligamentos, cartilagem e pele, demonstrando seus benefícios com baixas doses e seus prejuízos com doses elevadas (MENDONÇA et al., 2006).

A terapia com ultrassom pode ser aplicada por método contínuo ou térmico, com objetivo de utilizar o calor como princípio terapêutico; ou por método pulsado ou não térmico, quando não se deseja a produção de calor como, por exemplo, em processos inflamatórios (FREITAS et al., 2009). Diversos estudos demonstraram que o efeito não térmico de cavitação (formação de bolhas de vapor e gás em meio líquido

resultante da vibração ultra-sônica) provoca micromassagem tecidual capaz de alterar a permeabilidade da membrana e estimular a atividade celular (BAKER et al., 2001; EMSEN, 2007; FERIL JUNIOR et al., 2008).

Os efeitos celulares relacionados ao ultrassom terapêutico incluem maior expressão de leucócitos, macrófagos e fibroblastos, produção aumentada de fatores de crescimento, colágeno e óxido nítrico (NO) e incremento da angiogênese (ENNIS et al., 2007).

Estudo recente avaliou possíveis alterações histopatológicas e histomorfométricas do tecido sadio *in vivo* de ratos Wistar (n=30) irradiados com US de 3 MHz em diferentes intensidades (grupo I: 0,0 W/cm<sup>2</sup>; grupo II: 0,5 W/cm<sup>2</sup>; grupo III: 1,0 W/cm<sup>2</sup>; grupo IV: 1,5 W/cm<sup>2</sup> e grupo V: 2,0 W/cm<sup>2</sup>). O tratamento foi realizado durante quatro dias consecutivos, com duração de dois minutos de irradiação em uma área de 4 cm<sup>2</sup> na região dorsal direita dos animais. O lado esquerdo serviu como controle. Observou-se um discreto infiltrado inflamatório abaixo da epiderme e alteração das fibras colágenas, tornando-as mais delgadas e numerosas, principalmente nos grupos irradiados com 1,5 e 2,0 W/cm<sup>2</sup>. Notou-se também um aumento na espessura da epiderme nas amostras dos animais irradiados com diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos irradiados com 1,0; 1,5 e 2,0 W/cm<sup>2</sup> (De BEM et al., 2010).

Foram investigados os efeitos da energia ultra-sônica pulsátil sobre a cicatrização cutânea em ratos Wistar (n=20). Após realização de feridas cirúrgicas, esses ratos foram divididos em quatro grupos e submetidos a diferentes doses de ultrassom terapêutico: grupo I controle, sem tratamento; grupo II 0,4 W/cm<sup>2</sup>; grupo III 0,6 W/cm<sup>2</sup> e grupo IV 0,8 W/cm<sup>2</sup>. O tratamento foi iniciado imediatamente após o procedimento cirúrgico e se sucedeu por dez dias consecutivos. A frequência do equipamento utilizado foi de 1 MHz e o tratamento era realizado por três minutos. Ao final do 10º dia os animais foram eutanasiados e biópsias foram coletadas para verificação do nível de TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de lipoperoxidação) e hidroxiprolina (índice de síntese de colágeno). Foi evidenciada diminuição de TBARS em todos os grupos, sugerindo aceleração da fase inflamatória e aumento de hidroxiprolina nos grupos III e IV, o que pode estar relacionado à maior síntese de colágeno (FREITAS et al., 2009).

Tsai et al. (2006) em estudo com ultrassom terapêutico para tratamento de lesão tendínea evidenciaram que o ultrassom estimula a expressão de colágeno tipo I e III,



em um processo mediado pelo TGF- $\beta$ . Foi demonstrado em outro estudo que a exposição ao ultrassom pulsado poderia aumentar a expressão de TGF- $\beta$  em osteoblastos e influenciar a diminuição da concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$  em meio de cultura (LI et al., 2003).

Apesar de existirem publicações voltadas para a avaliação dos efeitos do ultrassom sobre a cicatrização, não há consenso sobre os parâmetros mais adequados de utilização desta terapia para a melhor evolução do processo.

Mesmo tendo se mostrado como recursos clínicos extremamente eficazes na diminuição do tempo de reposição tecidual, os mecanismos de ação da LLLT e do ultrassom terapêutico, assim como quais as suas influências sobre os processos de reparo e de regeneração, ainda são alvos de pesquisa.

Embora pesquisas abordando os efeitos das técnicas combinadas tenham sido desenvolvidas *in vitro* por Shah et al. (1999) e *in vivo*, em lesões cirúrgicas experimentais em tendão, por DEMIR et al. (2004) e por Wood et al. (2010), e em osso, por Lirani-Galvão et al. (2003) e Oliveira et al. (2011), a literatura é escassa no modelo de feridas cutâneas.

A partir do conhecimento e domínio dos mecanismos de ação da LLLT e do UST, estas técnicas auxiliares poderão fornecer imunomodulação de processos biológicos específicos e novas possibilidades terapêuticas, bem como permitir o estabelecimento de protocolos específicos para o tratamento de lesões diversas.

No presente estudo, os efeitos da LLLT e do UST foram analisados histopatologicamente e histomorfometricamente, tanto isolados quanto associados, bem como foi determinada, por imunoistoquímica, a expressão de TGF- $\beta$  nas células presentes no sítio do processo cicatricial. Buscaremos, desta forma, contribuir para a compreensão dos efeitos biológicos que tais terapias exercem sobre o reparo tecidual.

Até o momento não foram publicados trabalhos demonstrando os efeitos da laserterapia e do ultrassom terapêutico, isolados ou combinados, sobre o processo cicatricial e sobre a expressão de TGF- $\beta_1$  em modelo experimental de feridas cutâneas conforme os parâmetros avaliados neste estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) e do ultrassom terapêutico, isolados e associados, sobre o processo de reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, macroscopicamente, o processo de reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), submetidas à LLLT e ao ultrassom terapêutico, isolados e associados;
- Quantificar o infiltrado inflamatório nas amostras provenientes de feridas cirúrgicas cutâneas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), submetidas à LLLT e ao ultrassom terapêutico, isolados e associados;
- Quantificar vasos sanguíneos nas amostras provenientes de feridas cutâneas cirúrgicas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), submetidas à LLLT e ao ultrassom terapêutico, isolados e associados;
- Avaliar, por imunistoquímica, a expressão do Fator de Crescimento Transformador  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) nas amostras provenientes de feridas cirúrgicas cutâneas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), submetidas à LLLT e ao ultrassom terapêutico, isolados e associados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (n=24), machos, com idade entre seis e oito semanas e variação de peso entre 160 e 220 gramas. Os animais eram provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Durante o experimento, os animais ficaram alojados em gaiolas individuais, providas de camas de maravalhas, água e ração peletizada, *ad libitum*. O ambiente contou com iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6 horas e apagarem às 18 horas.

O desenvolvimento do modelo experimental foi conduzido no próprio biotério.

#### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A região dorsal dos animais foi tricotomizada após anestesia com Ketamine (100 mg/Kg) + Xylazine (10 mg/Kg). Após a assepsia do local com álcool iodado 2%, foi realizada marcação da região por meio de molde confeccionado em folha de transparência e demarcado com caneta permanente hidrocor. Com auxílio de um material cirúrgico esterilizado, a região foi pinçada (pinça clínica curva) e o fragmento de tecido cutâneo foi removido com uma tesoura reta, seguindo as linhas de força da pele, sem romper a fáscia (Figura 3).



Figura 3: Confeção da ferida cirúrgica. (1): Posicionamento do molde; (2): Demarcação com caneta hidrocor; (3): Remoção do tecido cutâneo.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam analgesia com Butorfanol (2 mg/kg), administrado via subcutânea e passaram por repouso pós-operatório de 2h, ou seja, eles ficaram em gaiolas individuais e não foram submetidos a nenhuma intervenção neste período.

Posteriormente a confecção das feridas, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo I (n=6), como controle, submetido a tratamento com laserterapia e ultrassom com aparelhos desligados (*sham*), grupo II (n=6), submetido à laserterapia; grupo III (n=6), submetido a tratamento com ultrassom e grupo IV (n=6), submetido à laserterapia e ultrassom associados (Figura 4).

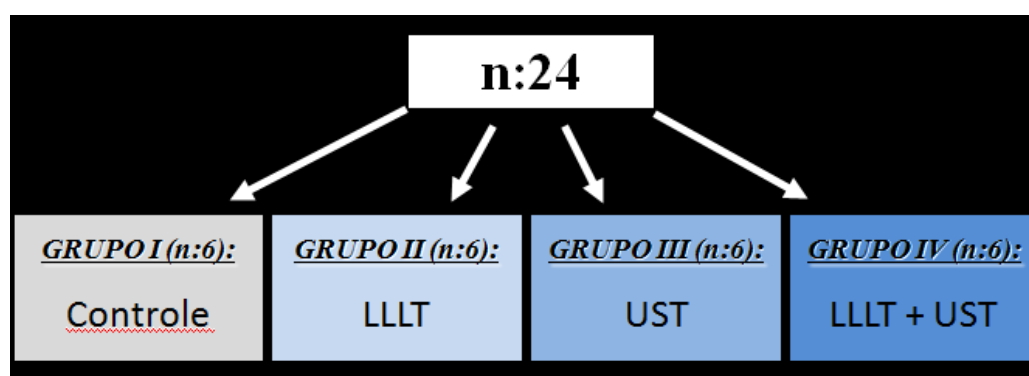


Figura 4: Esquema de divisão dos grupos

### 3.3 TRATAMENTOS

As aplicações do laser, isoladas ou associadas, foram realizadas 2h após o ato cirúrgico, a segunda aplicação 48h após o procedimento e uma última aplicação sete dias após a realização da lesão.

O ultrassom foi realizado a cada dois dias, sendo a primeira aplicação 2h após a lesão cirúrgica e a última no nono dia do tratamento. Quando a aplicação foi realizada no grupo de técnicas associadas, o ultrassom foi realizado logo após a aplicação do LLLT, uma vez que o gel utilizado para acoplar o transdutor ultra-sônico é à base de água, o que poderia interferir na absorção do laser.

### 3.3.1 Protocolo de Laserterapia

Foi utilizado laser de baixa intensidade da marca MMOPTICS, modelo Twin Laser, com emissão infravermelha, pulsátil, comprimento de onda de 780 nm, potência de pico de 70 mW (potência média de saída entre 0,5 a 3,5 mW) e aplicação por meio de fibra ótica. A aplicação do feixe foi em “varredura” na área central da ferida, permitindo irradiação uniforme da ferida cirúrgica cutânea. Os animais dos grupos II e IV tiveram as feridas submetidas à LLLT nos seguintes parâmetros: 15 mW de potência, dose de 3,8 J/cm<sup>2</sup>, 15 s de aplicação (Figura 5).



Figura 5: LASER MMOPTICS (Sao Carlos, Brasil), modelo Twin Laser

### 3.3.2 Protocolo de aplicação do ultrassom terapêutico

Foi utilizado o ultrassom terapêutico da marca IBRAMED, modelo Sonopulse Compact, com os seguintes parâmetros: modo pulsado, frequência de 1 MHz, intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup> e duração de 3 min de aplicação, sendo utilizado gel a base de água como meio de condução. O cabeçote do aparelho foi mantido sobre a lesão onde realizamos movimentos circulares leves, sem compressão nas mesmas. (Figura 6).



Figura 6: Ultrassom IBRAMED (Amparo, Brasil), modelo Sonopulse Compact

### 3.4 EVOLUÇÃO MACROSCÓPICA DA LESÃO

A evolução do processo cicatricial foi acompanhada por meio de fotografias, com câmera digital da marca Sony, modelo DSC-W380. A câmera ficou afixada a um tripé, mantido a distância padronizada dos animais. As fotografias foram realizadas imediatamente após o ato cirúrgico e em intervalos de dois dias, até o 10<sup>o</sup> dia.

Foram registrados a área das lesões imediatamente após a sua confecção, no quinto, sétimo e décimo dias de observação pós-operatória, em todos os grupos experimentais. Os registros foram obtidos por meio de decalque *in loco* sobre uma folha delgada de transparência, previamente esterilizada, com uma caneta permanente hidrocor de ponta fina (Figura 7).

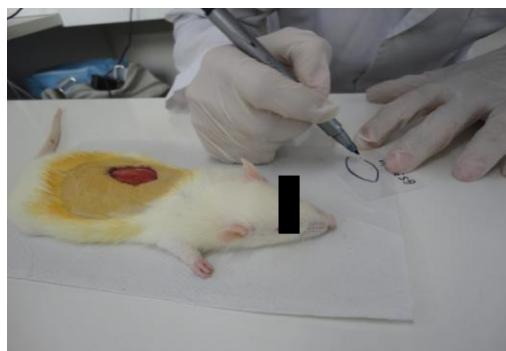


Figura 7: Registro da área da lesão em transparência, com caneta hidrocor

Esses registros foram copiados com auxílio de um *scanner* digital e armazenados, para posterior processamento e análise computacional utilizando um programa específico de processamento e análise de imagens (Figura 8).

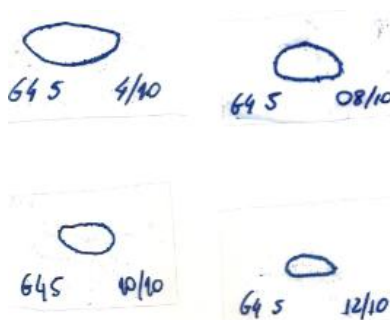


Figura 8: Área da lesão digitalizada.

Os animais foram observados diariamente para detecção de possíveis sinais de infecção secundária.

### 3.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CUTANEAS

Um dia após o último tratamento, todos os animais envolvidos no experimento foram eutanasiados por sobredose anestésica com Ketamine (100 mg/Kg) e Xylazine (10 mg/Kg).

Foram obtidas, por remoção excisional, as áreas correspondentes à localização da ferida cirúrgica, abrangendo a pele adjacente às bordas da ferida, bem como todo o tecido cicatricial em profundidade.

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% imediatamente após obtenção e submetidas ao processamento histológico de rotina.

### 3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

O material embocado em parafina foi submetido à microtomia com 5µm de espessura. Após a confecção da lâmina, cortes correspondentes a cada amostra foram separados para realização de coloração de rotina em hematoxilina e eosina.

Os cortes foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 250x, 400x e 1000x, em toda sua extensão. A análise foi realizada por dois diferentes observadores com formação e experiência em histopatologia, em toda a extensão do corte. A partir desta avaliação, foram selecionadas, em aumento de 400x, cinco áreas em cada amostra para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), por meio de câmera digital acoplada a microscópio óptico.

As imagens capturadas foram processadas em programa de morfometria semi-automático Axiovision® (Versão 4.5 para Windows), aprovado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA. Através da morfometria foi realizada contagem de células inflamatórias e luz de vasos sanguíneos. Não foram contados vasos com corte tangencial que não atingiram a luz, assim como células em mitose e leucócitos em rolamento ou intravasculares.

As contagens obtidas nos cinco campos em cada amostra foram somadas e o resultado foi expresso por média aritmética simples, assim como o total das contagens de cada grupo.

### 3.7 ANÁLISE IMUNOISTOQUIMICA

O método para detectar a expressão de TGF- $\beta_1$  envolveu as etapas: desparafinização por 20min (60°C) e embebição em três banhos de xilol por 3min cada; hidratação em álcool 100%, 95% e 70% por 3min em cada; enxague em água destilada; bloqueio da peroxidase endógena ( $H_2O_2$  – 0,4% por 30min /100  $\mu$ L por corte); recuperação antigênica em banho Maria a 95°C por 40min, em PBS; resfriar por 20min em temperatura ambiente e enxague com PBS por 1min; adição de quatro gotas de *Background Sniper* sobre o corte e incubação por 15min (temperatura ambiente); enxague em tampão PBS (1min). Os cortes preparados foram incubados com o anticorpo primário (TGF beta (V): sc-146; Santa Cruz, INC.) (Diluição 1:100  $\mu$ L) por 1h. Após, enxague duplo em PBS (2min); gotejamento do anticorpo secundário *Link Universal Trekkie* sobre o corte e incubação por 20min (temperatura ambiente); enxague duplo em PBS (2min); incubação câmara úmida, por 10min com *TrekAvidin-*



*HRP(Label)*: estreptavidina (temperatura ambiente); enxague duplo em PBS (2min cada); incubar com uma gota do cromógeno *Betazoid DAB Chromogen* (DAB) homogeneizado em 1 ml de PBS (5min); enxague duplo em água destilada e em PBS; contracoloração com hematoxilina (1min); enxague duplo em água destilada e posteriormente em PBS (1min cada); desidratação em três banhos de álcool 100% (1min cada) e seguido por três banhos em xilol (1min cada); montagem das lâminas. O controle negativo foi realizado omitindo-se, em corte selecionado, o anticorpo primário. A positividade foi determinada pela observação, em microscopia óptica, de coloração castanha intracitoplasmática.

As lâminas submetidas à imunistoquímica foram analisadas por dois diferentes observadores com formação e experiência em histopatologia e, a partir da avaliação de toda a extensão dos cortes, foram selecionadas em aumento de 400x, cinco áreas para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), por meio de câmera digital acoplada a microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha). As contagens obtidas nos cinco campos em cada amostra foram somadas e o resultado de cada animal foi expresso por média aritmética simples, assim como o total das contagens de cada grupo.

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados de cada grupo foram submetidos à análise estatística por meio do teste de variância ANOVA *one way*, seguido do teste de Tukey para verificar diferenças significantes entre os grupos. O software GraphPad InStat versão 3.0 foi utilizado. Resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.9 COMITÊ DE ÉTICA**

O desenho experimental foi submetido ao Comitê de ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, estando de acordo com os Princípios Éticos na

Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa/UFJF, com o Protocolo nº 034/2009.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de dois artigos científicos:

### APÊNDICE 1

“Immunological and Histopathological Aspects of Skin Healing and The Influence of Auxiliary Therapeutic Resources”

Autores: KARINE HELENA DE SOUZA LOPES; FERNANDO M AARESTRUP; ANA CRISTINA M GUALBERTO; BEATRIZ JULIÃO V AARESTRUP

Complementary Therapies in Medicine

Data da submissão: 08/05/2012

### APENDICE 2

“Effects of Low Level Laser and Therapeutic Ultrasound on Tissue Repair in Wistar Rats: Histopathological Study and TGF $\beta_1$  Expression”

Autores: KARINE HELENA DE SOUZA LOPES; FERNANDO M AARESTRUP; BEATRIZ JULIÃO V AARESTRUP

Wound Repair and Regeneration

Data da submissão: 30/07/2012

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que:

- Todos os tratamentos favoreceram a organização da matriz extracelular colagenosa em relação ao controle; ainda, a LLLT isoladamente e a combinação de ambas as técnicas possibilitam a reepitelização das feridas submetidas a estas modalidades terapêuticas.
- A LLLT e o UST atuam na redução do infiltrado inflamatório, porém as terapias associadas não potencializam o efeito das mesmas aplicadas isoladamente.
- O estímulo angiogênico exercido pelo UST estimula maior infiltrado inflamatório na área cicatricial, apesar do efeito imunomodulador exercido pela LLLT.
- O controle do infiltrado inflamatório exercido pela LLLT e pelo UST não é modulado pelo TGF $\beta$ 1.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 389-407.

ADZICK, N. S.; LORENZ, H. P. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon- The biology of scarless fetal wound repair. **Annals of Surgery**. v. 220, n. 1, p. 10-18, 1994.

ALTOMARE, M.; NASCIMENTO, A. P.; SOUZA, B. R.; AMADEU, T. P.; COSTA, A. M. A. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. **Wound Repair and Regeneration**. v. 17, n. 6, p. 825–831, 2009.

AMENDT, C.; MANN, A.; SCHIRMACHER, P.; BLESSING, M. Resistance of keratinocytes to TGF $\beta$ -mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. **Journal of Cell Science**. v.115, p. 2189-2198, 2002.

ASHCROFT, G. S. et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. **Nature Cell Biology**. v. 1, p. 260-6, 1999.

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical therapy**. v. 81, n. 7, p. 1351- 58, 2001.

BATISTA, A. C.; SILVA, T. A.; CHUN, J. H.; LARA, V. S. Nitric oxid sintesis and severity of human periodontal disease. **Oral diseases**, v. 8, n. 5, p. 254-60, 2002.

BAYAT, M.; AZARI, A.; GOLMOHAMMADI, M. G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed Gallium Aluminum Arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, n. 4, p. 465-70, 2009.

BRANCATO, S. K.; ALBINA, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. **The American Journal of Pathology**. v. 178. n. 1. p. 19-25, 2011.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 14, n. 1, p. 45-51, 2010.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in

diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 3, p. 177-183, 2006.

CASAROTTO, R. A.; ADAMOWSKI, J. C.; FALLOPA, F.; BACANELLI, F. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 85, n. 1, p. 162-65, 2004.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENÓRIO, A. M. P. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**. v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 44-100.

DAMANTE, C. A.; MARQUES, M. M.; DE MICHELI, G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo**. v. 13, n. 3, p. 88-93, 2008.

DE OLIVEIRA, R. G.; AARESTRUP, F. M.; MIRANDA, C.; VIEIRA, B. J.; FERREIRA, A. P.; ANDRADE, L. C. Low-level laser therapy reduces delayed hypersensitivity reaction to ovalbumin in balb/c mice. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, n. 6, p. 773-77, 2010.

DE BEM, D. M.; MACIEL, C. D.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 14, n. 2, p. 114-120, 2010.

DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCELI, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser+ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 35, n. 1, p. 84–89, 2004.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007.

\_\_\_\_\_. Gene Therapy and Wound Healing. **Clinics in Dermatology**. v. 25, n. 1, p. 79–92, 2007.

EMSEN, I. M. The effect of ultrasound on flap survival: An experimental study in rats. **Burns**. v. 33, n. 3, p. 369-371, 2007.

ENNIS, W. J.; LEE, C.; MENESES, P. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. **The Journal of Clinical Dermatology**. v. 25, n. 1, p. 63–72, 2007.

FERIL JUNIOR, L. B.; TACHIBANA, K.; OGAWA, K.; YAMAGUCHI, K.; SOLANO, I. G.; IRIE, Y. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. **Journal of Medical Ultrasonics**. v. 35, n. 4, p. 153–160, 2008.

FERREIRA, L. M.; GRAGNANI, A.; FURTADO, F.; HOCHMAN, B. Control of skin scarring response. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 81, n. 3, p. 623-629, 2009.

FREITAS, T. P.; GOMES, M.; FRAGA, D. B.; FREITAS, L. S.; REZIN, G. T.; SANTOS, P. M.; SILVEIRA, P. C.; PAULA, M. M.; PINHO, R. A.; STRECK, E. L. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. **Journal of Surgical Research**. v. 161, n. 1, p. 168-171, 2009.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia - Gartner: em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 576 p.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

GONÇALVES, W. L. S. et al. 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**. v. 40, n. 6, p. 877-884, 2007.

GUNTER, C. I.; MACHENS, H. G. New Strategies in Clinical Care of Skin Wound Healing. **European Surgical Research**. v. 49, n. 11, p. 16–23, 2012.

HACKAM, D. J.; FORD, H. R. Cellular, Biochemical, and Clinical Aspects of Wound Healing. **Surgical Infections**. v. 3 (S), p. s23-s35, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HELAYEL, P. E.; CONCEIÇÃO, D. B.; OLIVEIRA FILHO, G. R. Bloqueios nervosos guiados por ultra-som. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 57, n. 1, p. 106-123, 2007.

HENEMYRE-HARRIS, C.; ADKINS, A. L.; CHUANG, A. H.; GRAHAM, J. S. Addition of epidermal growth factor improves the rate of sulfur mustard wound healing in an in vitro model. **Journal of Plastic Surgery**. v. 8, p. 136-150, 2008.

HINORUBU, I. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- $\beta$  and CTGF. **Current Opinion in Rheumatology**. v. 14, n. 6, p. 681-685, 2002.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.

HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **Journal of Periodontology**. v. 72, n. 5, p. 590-597, 2001.

HOWDIESHELL, T.R. et al. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **Journal of Surgical Research**. v. 96, n. 2, p. 173-182, 2001.

HUNT, T. K.; HOPF, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. **Advances in Skin Wound Care**. v. 13 (S2), p. 6-11, 2000.

INOE, A. P. et al. Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência HeNe em feridas cutâneas de coelhos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**. v. 11, n. 1, p. 27-30, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 91-124.

LI, J. K.; CHANG, W. H.; LIN, J. C.; RUAAN, R. C.; LIU, H. C.; SUN, J. S. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**. v. 24, n. 13, p. 2379-2385, 2003.

LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**. dez 2009.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, n. 6, p. 735-40, 2006.

LUCKETT-CHASTAIN, L. R.; GALLUCCI, R. M. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor- $\beta$  expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. **British Journal of Dermatology**. v.161, n. 2, p. 237-248, 2009.

MARGADANT, C.; SONNENBERG, A. Integrin-TGF- $\beta$  crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. **European Molecular Biology Organization Reports**. v. 11, n. 2, p. 97-105, 2010.



MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annual Review of Cell and Development Biology**. v. 6, p. 597-641, 1990.

\_\_\_\_\_. TGF-beta signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**. v. 67, p. 753-791, 1998.

MAUVIEL, A. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in skin: stromal to epithelial cross-talk. **Journal of Investigative Dermatology**. v., 129, p. 7–9, 2009.

McANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. **Journal of Cell Biology**. v. 39, p. 666-671, 2007.

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

MENDONÇA, A. C.; FERREIRA, A. S.; BARBIERI, C. H.; THOMAZINE, J. A.; MAZZER, N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 14, n. 3, p. 152-157, 2006.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

NISHIMURA, S. L. Integrin-mediated transforming growth factor-activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. **American Journal of Pathology**. v. 175, n. 4, p. 1362-1370, 2009.

OLIVEIRA, P. et al. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 15, n.3, p. 200-5, 2011.

OLSSON, D. C.; MARTINS, V. M. V.; PIPPI, N. L.; MAZZANTI, A.; TOGNOLI, G. K. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. **Ciência Rural**. v. 38, n. 4, p. 1199-1207, 2008.

PINTO, N. C.; PEREIRA, M. H. C.; STOLF, N. A. G.; CHAVANTES, M. C. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: therapeutic proposal. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 24, n. 1, p. 88-91, 2009.

PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS, C.; DO VALE, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics - Part I. The molecular basis of scar formation. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 66, n. 1, p. 1-10, 2012.

RANGANATHAN, P. et al. Expression profiling of genes regulated by TGF- $\beta$ : differential regulation in normal and tumor cells. **BMC genomics**. v. 8, p. 98, 2007.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v. 22, p. 141-150, 2004.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**. v. 49, n. 11, p. 35-43, 2012.

RIBEIRO, M. A. G. et al. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16J/cm<sup>2</sup>  $\lambda$  660-nm laser irradiation. **Indian Journal of Dental Research**. v. 20, n. 3, p. 390, 2009.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Transforming growth factor- $\beta$ . In: **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2 ed. New York: Plenum, 1996, p. 275-308.

ROCHA JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

\_\_\_\_\_, VIEIRA, B. J.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 6, n. 3, p. 258-266, 2007.

\_\_\_\_\_, VIEIRA, B. J.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Low-level laser therapy increases transforming growth factor- $\beta$ 2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 2, p. 303–307, 2009.

ROCHA, C. L. J. V. Histofisiologia e classificação das queimaduras: consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. v. 1, n. 3, p. 140-147, 2009.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.

SANDLER et al. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 e Th2 responses in tissue repair. **The Journal of Immunology**. v. 171, p. 3655-67, 2003.

SANTIBAÑEZ, J. F.; QUINTANILLA, M.; BERNABEU, C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**. v. 121, p. 233–251, 2011.

SCHULTZ, G.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v. 17, p. 153–162, 2009.

SHAH, M.; FOREMAN, D.M.; FERGUSON, M.W. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. **Journal of Cell Science**., v. 107, p. 1137-1157, 1994.

\_\_\_\_\_. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. **Journal of Cell Science**. v. 108, p. 985- 1002, 1995.

\_\_\_\_\_; REVIS, D.; HERRICK, S.; BAILLIE, R.; THORGEIRSON, S.; FERGUSON, M.; ROBERTS, A. Role of elevated plasma transforming growth factor-beta1 levels in wound healing. **American Journal of Pathology**. v. 154, n. 4, p. 1115-24, 1999.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**. v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SNYDER, R. J. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. **Clinics in Dermatology**. v. 23, p. 388-395, 2005.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. **Dermatologic Surgery**. v. 34, p. 991-1000, 2008.

SUSCHEK, C. M.; MAHOTKA, C.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. UVB Radiation-mediated expression of inducible nitric oxide synthase activity and the augmenting role of co-induced TNF-a in human skin endothelial cells. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 123, p. 950 –957, 2004.

TANAKA, A.; HATOKO, M.; TADA, H.; LIOKA, H.; NITSUMA, K.; MIYAGAWA, S. Expression of p53 family in scars. **Journal of Dermatological Science**. v. 34, n. 1, p. 17-24, 2004.

TSAI, W.C. et al. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor  $\beta$ . **Journal of Orthopaedic Research**. v. 24, n. 6, p.1310-1316, 2006.

WANG, X. J. et al. Role of TGFb-mediated inflammation in cutaneous wound healing. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v. 11, n. 1, p. 112–117, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**. v. 83, p. 835-870, 2003.

WOOD, V. T. et al. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 42, n. 6, p. 559-65, 2010.

YANG, L. et al. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. **American Journal of Pathology**. v. 159, p. 2147-57, 2001.

YOON, B. S. et al. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Development**. v. 19, n. 6, p.887-902, 2010.

ZOCHODNE, D. W.; LEVY, D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. **Cellular and Molecular Biology**. v. 51, n. 3, p. 255-267, 2005.

ZHONG, H. L. et al. Effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$ 1 on the healing of reconstructed dura by carbon dioxide laser soldering in minipigs. **Chinese Medical Journal**. v. 125, n. 4, p.611-6, 2012.

ZHU, J.; Yamane, H.; Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Population. **The Annual Review of Immunology**. v. 28, n. 1, p. 445-89, 2010.

**APÊNDICE 1**

Elsevier Editorial System(tm) for Complementary Therapies in Medicine

Manuscript Draft

Manuscript Number: CTIM-D-12-00088

Title: IMMUNOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF SKIN HEALING AND THE  
INFLUENCE OF AUXILIARY THERAPEUTIC RESOURCES

Article Type: Review article (max 3500 words)

Keywords: Healing; Inflammation; Low Level Laser Therapy; Ultrasound Therapy; TGF $\beta$ .

Corresponding Author: Mrs KARINE HELENA DE SOUZA LOPES, Jr

Corresponding Author's Institution: Federal University of Juiz de Fora

First Author: KARINE HELENA DE SOUZA LOPES, Jr

Order of Authors: KARINE HELENA DE SOUZA LOPES, Jr; FERNANDO M AARESTRUP, PhD; ANA  
CRISTINA M GUALBERTO, Student; BEATRIZ JULIÃO V AARESTRUP, PhD

Abstract: The healing process occurs in a sequence of events that involves haemostasis, inflammation, cell proliferation and maturation of the extracellular matrix. In addition to being directly and indirectly influenced by local and systemic factors, a complex network of chemical mediators determines the key aspects of the evolution of healing, affecting parenchymal cell behaviour and stromal scarring. The present study reviews the literature that investigates the histophysiology of the skin, addressing skin healing from a histopathological and immunological point of view with the purpose of enhancing the understanding of this pathological process. Such knowledge is essential for understanding the biological effects of complementary therapies, such as low level laser therapy and ultrasound therapy, as well as for the safe establishment of clinical protocols.

Cover Letter

Dear editor, we are sending the manuscript entitled "Immunological and Histopathological Aspects of Skin Healing and the Influence of Auxiliary Therapeutic Resources" for publication in the "Complementary Therapies in Medicine". In this paper we investigated the histophysiology of the skin, addressing skin healing from a histopathological and immunological point of view with the purpose of enhancing the understanding of this pathological process.

Sincerely,

Beatriz Aarestrup

## IMMUNOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF SKIN HEALING AND THE INFLUENCE OF AUXILIARY THERAPEUTIC

### RESOURCES

KARINE HELENA DE SOUZA LOPES <sup>a</sup>

FERNANDO MONTEIRO AARESTRUP <sup>b</sup>

ANA CRISTINA MOURA GUALBERTO <sup>c</sup>

BEATRIZ JULIÃO VIEIRA AARESTRUP <sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> Physiotherapist, Postgraduate student, Masters in Health, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais.

<sup>b</sup> MD, DDS, PhD in Pathology, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais, Researcher at the Center for Reproduction Biology – Head of the Laboratory of Immunopathology and Clinical Immunology, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais.

<sup>c</sup> Biological Science Student, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais.

<sup>d\*</sup> DDS, PhD in Pathology, Department of Morphology/Histology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais. Researcher at the Center for Reproduction Biology – Laboratory of Immunopathology and Clinical Immunology, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais.

\* Corresponding author at: Center for Reproduction Biology – Laboratory of Immunopathology and Clinical Immunology, Federal University of Juiz de Fora/Minas Gerais, Brazil. Tel.: + 55 32 2102-3250.

**\*Manuscript**

## **ABSTRACT**

The healing process occurs in a sequence of events that involves haemostasis, inflammation, cell proliferation and maturation of the extracellular matrix. In addition to being directly and indirectly influenced by local and systemic factors, a complex network of chemical mediators determines the key aspects of the evolution of healing, affecting parenchymal cell behaviour and stromal scarring. The present study reviews the literature that investigates the histophysiology of the skin, addressing skin healing from a histopathological and immunological point of view with the purpose of enhancing the understanding of this pathological process. Such knowledge is essential for understanding the biological effects of complementary therapies, such as low level laser therapy and ultrasound therapy, as well as for the safe establishment of clinical protocols.

## **KEY WORDS**

Healing. Inflammation. Low Level Laser Therapy. Ultrasound Therapy. TGF $\beta$ .



## 1 SKIN HEALING

The healing process includes five temporally overlapping phases with non-distinctive limits: haemostasis, inflammation, demolition, proliferation and maturation.<sup>1-3</sup>

The haemostatic phase occurs immediately after injury and depends on platelet activity and the coagulation cascade.<sup>4</sup> During degranulation, activated platelets release mediators such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF), thromboxane and platelet-activating factor (PAF), resulting in the formation of a stable platelet plug. This platelet-rich plug is stabilised at the end of the coagulation cascade by the conversion of fibrinogen to fibrin. Furthermore, the fibrin clot provides a foundation for circulating leukocytes, which will trigger inflammation, the next healing phase.<sup>2</sup>

The products of platelet degranulation diffuse into the extravascular environment, forming a chemotactic gradient for leukocyte diapedesis. The neutrophils are initially responsible for an acute response that lasts approximately 72 hours.<sup>5-7</sup>

The inflammatory process is directly responsible for demolition and for proliferation, which is triggered by the release of growth factors in proportion to the level of phagocytic activity. Growth factors are glycoproteins that stimulate mitosis and differentiation in the remaining healthy cells. Growth factor activity stimulates the appearance of myofibroblasts, that have the ability to contract the edges of the wound.<sup>8, 9</sup> In addition, the metabolic activity of these cells results in the deposition of a new extracellular matrix, which forms the granulation tissue.<sup>1, 10</sup>

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main growth factor regulating angiogenesis during the development of scar tissue; its gene expression is higher in the resident macrophages of the healing dermis and the keratinocytes surrounding the injury.<sup>5</sup> In addition to VEGF, angiopoietins – a second family of vascular growth factors

– act on the endothelium. Unlike VEGF, angiopoietins, especially angiopoietin-1, do not regulate endothelial cell proliferation but rather regulate the differentiation and maturation of these cells.<sup>10</sup> The other important growth factors associated with angiogenesis include fibroblast growth factor (FGF), which has a mitotic effect and is synthesised by fibroblasts and the remaining endothelial cells, and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a proinflammatory cytokine involved in vascular remodelling under conditions of oxidative stress.<sup>10, 12</sup>

Functional maturation is finally achieved with the release of proteases that degrade the excess collagen that is deposited.<sup>13, 14</sup> At the end of re-epithelialisation, angiogenesis and dermal extracellular matrix synthesis, the tissues undergo maturation, which includes: cytoarchitectural reorganisation of keratinocytes; restitution of the keratin layer; organization of connective fibres; reestablishment of the vasculature and apoptosis of myofibroblasts.<sup>1, 6</sup>

The evolution of these various phases of repair is directly or indirectly influenced by inflammatory cells. An understanding of the cells and cytokines involved in this process is essential for effective modulation.<sup>10</sup>

## **2 CELLS AND CYTOKINES IN SKIN HEALING**

Many studies have been conducted to understand the influence that the intensity and composition of inflammatory infiltrates and cytokines have on tissue repair.<sup>5, 10, 15-17</sup>

Neutrophil migration is triggered by chemotactic factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), which is released during the haemostatic phase.<sup>18</sup> After the process of transmigration, neutrophils rapidly phagocytose the small particles, cellular debris and bacteria that permeate the region of the injury.<sup>20</sup> If the injury persists or complex microorganisms remain at the end of the neutrophil's lifespan, the cell

undergoes apoptosis and releases lipoxin – a chemotactic glycoprotein for mononuclear leukocytes.<sup>3</sup>

Monokines synthesised by lymphocytes are responsible for the increase in cellularity, as are macrophage inflammatory proteins (MIPs) and monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1). Following transmigration, macrophages (always with the reciprocal action of T lymphocytes) are primarily activated by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), undergoing hypertrophy and increased metabolism. Activated macrophages phagocytose microorganisms and debris, present antigens and release growth factors, such as transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , FGF, PDGF and VEGF, in addition to releasing lymphokines that maintain the lymphocyte population.<sup>15, 16, 21</sup>

Macrophages are extremely important during the inflammatory phase of tissue repair because they phagocytose large inert particles, cellular debris larger than that processed by neutrophils and equally larger or toxic microorganisms. In addition to their phagocytic activity, macrophages stimulate the development of granulation tissue through the synthesis of lipid mediators and peptides necessary for tissue repair, such as complement components, coagulation factors, collagenases and metalloproteinases.<sup>1, 5, 22</sup>

In addition to maintaining and activating the macrophage population through the production of lymphokines and IFN- $\gamma$ , lymphocytes effectively participate in the local immune response beginning on the fourteenth day after injury.<sup>1, 5</sup>

Lymphocytes are divided into three populations: T lymphocytes, B lymphocytes and natural killer (NK) cells. T and B lymphocytes are part of the acquired immune response. The cellular immune response is coordinated by T lymphocytes through antigen recognition. In addition to differentiating from a lymphocyte precursor, T cells also emerge from the thymus after the expression of a T-cell receptor (TCR) and CD4

(CD4+ T cells, or T helpers) or CD8 (CD8+ T cells, or regulatory lymphocytes) cells. In the cellular immune response, T lymphocytes control the functionality of monocytes, macrophages and B lymphocytes by activating (TCD4) or inhibiting (TCD8) them.<sup>23</sup>

It should be noted that TCD4 lymphocytes are further subdivided into Th1 and Th2 T helper lymphocytes based on their pattern of cytokine production. The Th1 response produces the cytokines IFN- $\gamma$ , interleukin-2 (IL-2) and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and is associated with the proinflammatory immune response present in tissue injuries. Conversely, the Th2 response produces the cytokines IL-4, IL-5 and IL-10; assists in the synthesis of antibodies by plasma cells and the activation of eosinophils; and participates in wound healing and fibrotic processes.<sup>24-26</sup>

The cytokines present at the site of inflammation are important in the stimulation and evolution of the healing process, as these cytokines participate in the activation of endothelial cells and the expression of adhesion molecules, thus contributing to the recruitment and accumulation of phagocytic cells at the injured area.<sup>21</sup>

Interleukin-1, which is produced by macrophages and keratinocytes in addition to Th cells, positively modulates adhesion molecules and metabolically activates neutrophils. Interleukin-1 is also responsible for mitosis and the differentiation of keratinocytes, in addition to stimulating fibroblasts for the early production of collagen during the repair process.

Interleukin-6 is produced by neutrophils, macrophages and fibroblasts and is a potent stimulator of mitosis in fibroblasts.<sup>21</sup>

Tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is a cytokine that mediates the acute inflammatory response. TNF- $\alpha$  is important for the activation of endothelial cells and the expression of adhesion molecules, contributing to the recruitment and accumulation of phagocytes in the inflamed area.<sup>10, 20, 21</sup>

In general, these cytokines stimulate endothelial receptors that induce the production of nitric oxide (NO), which is produced by macrophages, CD4+T lymphocytes, neutrophils, fibroblasts, endothelial cells, bone cells and chondrocytes in response to several inflammatory stimuli. NO is produced through the conversion of L-arginine by enzymes generally called NO synthases (NOS).<sup>27</sup> At physiological levels, NO participates in the modulation of immune responses; however, NO may act as a cytotoxic molecule at high concentrations, leading to secondary lesions in inflamed areas. <sup>28-30</sup>

Platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) are also highlighted as important growth factors in skin repair.<sup>5</sup> Large amounts of PDGF are released immediately after tissue injury during platelet degranulation. PDGF was the first growth factor shown to act as a chemo attractant for macrophages, neutrophils and fibroblasts. Moreover, PDGF stimulates the synthesis of elements from the extracellular matrix, including collagen, through fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation.<sup>5, 10</sup>

TGF- $\beta$  is present in the isoforms TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and TGF- $\beta_3$ . TGF- $\beta_3$  has been considered by several authors as an antagonist to the other isoforms.<sup>10, 31-33</sup> Released by platelets, macrophages and keratinocytes immediately after tissue injury, TGF- $\beta$  participates in all stages of the healing process. TGF- $\beta$  has chemotactic properties specific for neutrophils, macrophages and fibroblasts; influences angiogenesis, dermal reconstitution and re-epithelialisation; and induces various types of cells to produce more TGF- $\beta_1$ , thus increasing its concentration at the site of inflammation.<sup>34-38</sup>

The effect of TGF- $\beta_1$  on re-epithelialisation is apparently paradoxical. It inhibits the proliferation of keratinocytes both *in vivo* and *in vitro*, which suggests that it is a negative regulator of re-epithelialisation. However, TGF- $\beta_1$  also induces integrin

expression, which is critical for the migration of keratinocytes over the provisional fibronectin-rich matrix.<sup>5</sup>

Transgenic mice (n=60) expressing a TGF- $\beta$ <sub>1</sub> transgenic in keratinocytes showed delayed healing after a burn injury caused by a CO<sub>2</sub> laser.<sup>43</sup> Conversely, transgenic mice expressing a dominant negative type II TGF- $\beta$  receptor exclusively on keratinocytes showed accelerated re-epithelialisation of skin injuries.<sup>44</sup>

However, Adzick et al.<sup>34</sup> showed that molecules of the TGF- $\beta$  superfamily are directly related to the quality of the scar tissue formed. Studies have shown that a reduction in the expression of this cytokine hinders wound closure by interfering with angiogenesis and the recruitment of cells such as macrophages and fibroblasts. In contrast, excess TGF- $\beta$  may lead to the development of fibrosis due to the excessive stimulation of fibroblast metabolism and excessive production of extracellular matrix.<sup>34</sup>

### **3 AUXILIARY RESOURCES FOR THE HEALING PROCESS**

#### **3.1 Low Level Laser Therapy**

The use of low level laser therapy (LLLT) to assist wound healing has been a clinical reality for several decades, becoming a useful resource for this type of treatment because of its easy application.<sup>50</sup>

LLLT exhibits photochemical and photophysical properties, which allow the laser light to interact at the biomolecular level by means of bioelectric, biochemical and bioenergetic cell processes, thereby promoting anti-inflammatory and analgesic effects and accelerating wound healing by stimulating several biological systems, such as increased cell activity and proliferation, increased DNA synthesis, the modulation of growth factor production and the reduced production of prostaglandins.<sup>51, 52</sup>

Rocha Júnior et al.<sup>53</sup> investigated the evolution of the repair process in skin wounds associated with laser therapy. In this study, the skin of the dorsal region of

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) was lesioned and subjected to low level laser therapy at a wavelength of 780 nm, a dose of 3.8 J/cm<sup>2</sup> and a power of 15 mW for 15 seconds. The animals (n=12) were divided into two groups (one control and one treated group), and the treated group was subjected to three sessions of laser therapy. The animals were euthanized on the tenth day. The results showed increased neovascularisation and fibroblast proliferation and decreased levels of inflammatory infiltrate in the surgical wounds subjected to laser therapy. These results suggests that low level laser therapy is an effective method for modulating tissue repair, as it contributes to faster and more organised wound healing.<sup>53</sup>

Another study used LLLT to treat skin wounds in an experimental model with Wistar rats, demonstrating high levels of TGF- $\beta$  in the treated group compared to the control group; however, this therapy activated an important inducer of apoptosis in epithelial cells during the repair process.<sup>33</sup>

Bayat et al.<sup>54</sup> conducted a study to evaluate the effects of gallium-aluminium arsenide (GaAlAs) lasers on the healing of surgically induced wounds in rats, using a wavelength of 780 nm, a dose of 2 J/cm<sup>2</sup> and a frequency of 2,336 Hz. The GaAlAs-treated group exhibited an increase in the number of fibroblasts, blood vessels and tensile resistance, in addition to a decrease in the number of macrophages compared to the control group.<sup>54</sup>

The effects of LLLT on wound healing were also evaluated in an experimental model with 70 Wistar rats divided into control and treated groups. A dorsomedial longitudinal incision was made and sutured with simple stitches. The wounds of the treated group were irradiated at three different points daily using a helium-neon (HeNe) laser apparatus with a wavelength of 632.8 nm and a dose of 4 J/cm<sup>2</sup> for 12 seconds. Immunohistochemistry was performed using anti-CD45-LCA to identify the

inflammatory cells, and a histochemical evaluation with Picrosirius staining was used to identify collagen types I and III. The results of the study suggest that LLLT does not change the quality of the inflammatory response but reduces its intensity and increases collagen deposition at the beginning of the healing process without interfering with scar maturation.<sup>56</sup>

### **3.2 Ultrasound Therapy**

By definition, an ultrasound is produced by sound waves with frequencies above 20,000 Hz. A sequential array of piezoelectric crystals contained in the transducer produces an ultrasound from electrical power.<sup>57</sup> When transmitted to biological tissues, sound energy is able to produce cellular changes through mechanical effects.<sup>58</sup>

Several studies have shown that the non-thermal effect of cavitation (the formation of vapour and gas bubbles in liquid medium as a result of ultrasonic vibration) causes micromassage of the tissue and is capable of altering membrane permeability and stimulating cell activity.<sup>48, 59, 60</sup>

The cellular effects related to ultrasound therapy include the increased recruitment of leukocytes, macrophages and fibroblasts, increased production of growth factors, collagen and NO and increased angiogenesis.<sup>61</sup>

A recent study evaluated the possible histopathological and histomorphometric changes of healthy tissue in Wistar rats (n=30) irradiated with 3 MHz ultrasound at different intensities (group I: 0.0 w/cm<sup>2</sup>, group II: 0.5 w/cm<sup>2</sup>, group III: 1.0 w/cm<sup>2</sup>, group IV: 1.5 w/cm<sup>2</sup> and group V: 2.0 w/cm<sup>2</sup>). The treatment was performed for four consecutive days, with a two-minute irradiation of a 4 cm<sup>2</sup> area on the right dorsal region of the animals. The left side was used as the control. A mild inflammatory infiltrate was visible below the epidermis and caused changes in the collagen fibres, making them thinner and more numerous, particularly in the groups irradiated with 1.5



and 2.0 w/cm<sup>2</sup>. An increase in epidermal thickness was also noted in the samples obtained from the irradiated animals, with significant differences between the control group and the groups irradiated with 1.0, 1.5 and 2.0 w/cm<sup>2</sup>.<sup>62</sup>

The effects of pulsed ultrasonic energy on skin healing in Wistar rats (n=20) were also investigated. After the introduction of surgical wounds, the rats were divided into four groups and subjected to different doses of ultrasound therapy: group I – control, no treatment; group II – 0.4 w/cm<sup>2</sup>; group III – 0.6 w/cm<sup>2</sup> and group IV – 0.8 w/cm<sup>2</sup>. The treatment was initiated immediately after the surgical procedure and continued for ten consecutive days. The equipment used a frequency of 1 MHz, and the treatment was performed for three minutes. The animals were euthanized at the end of the tenth day, and the biopsy samples were collected to determine the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS–index of lipid peroxidation) and hydroxyproline (index of collagen synthesis) levels. Reduced TBARS levels were noted in all of the groups, suggesting an acceleration of the inflammatory phase. Increased levels of hydroxyproline were noted in groups III and IV, which may be related to increased collagen synthesis.<sup>63</sup>

A study using ultrasound therapy for the treatment of tendinous lesions showed that ultrasound stimulates the expression of collagen types I and III in a process mediated by TGF- $\beta$ .<sup>64</sup> Another study showed that exposure to pulsed ultrasound could increase the secretion of TGF- $\beta$  from osteoblasts and reduce the concentration of interleukin-6 (IL- 6) and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in the culture medium.<sup>65</sup>

## **CONCLUSION**

Knowing the immunological and histopathological events involved in skin repair and understanding the action mechanisms of the current complementary therapies can support the establishment of treatment protocols aimed at modulating the healing

process and reducing the time course of wound repair and the possible defects caused by several factors, in addition to improving the quality of newly formed tissue.

**CONFLICT OF INTEREST**

None

## REFERENCES

1. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Derm.* 2003;78:393-410.
2. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-289.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. *Patologia: bases patológicas das doenças*, 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005: pp. 91-124.
4. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127:514-525.
5. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005;41:25-51.
6. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.* 2009;84: 257-262.
7. Ribeiro MAG, Albuquerque Júnior RLC, Barreto ALS, Oliveira VGM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16J/cm<sup>2</sup> λ 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009;20:390.
8. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127:526-537.
9. Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability.* 2011;20:108-120.
10. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83:835-870.
11. Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD, Jr., Sathyanarayana, et al. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res.* 2001;96:173-182.
12. Ranganathan P, Agrawal A, Bhushan R, Chavalmane AK, Kalathur RK, Takahashi T, et al. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics.* 2007;8:98.
13. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2000;13:6-11.
14. Henemyre-Harris CL, Adkins AL, Chuang AH, Graham JS. Addition of epidermal growth factor improves the rate of sulfur mustard wound healing in an in vitro model. *Eplasty.* 2008;8:e16.

15. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69:513-521.
16. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:79-92.
17. Schultz G, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17:153–162.
18. Gartner LP, Hiatt JL. Sangue e hematopoese. In: Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia: em cores*, 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. pp. 180-204.
19. Mcanulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:666-671.
20. Hackam DJ, Ford HR. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surg Infect (Larchmt).* 2002;3 Suppl 1:S23-35.
21. Hatanaka E, Curi R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Farm.* 2007;88:53-58.
22. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738-746.
23. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins S, eds. *Fundamentos de Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 6nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. pp. 44-100.
24. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14:681-685.
25. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol.* 2003;171:3655-3667.
26. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-489.
27. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol.* 2001;72:590-597.
28. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis.* 2002;8:254-260.
29. Suschek CV, Mahotka C, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. UVB radiation-mediated expression of inducible nitric oxide synthase activity and the augmenting role of coinduced TNF-alpha in human skin endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 2004;123:950- 957.
30. Zochodne DW, Levy D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51:255-267.

31. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 3):985-1002.
32. Maier P, Broszinski A, Heizmann U, Boehringer D, Reinhard T. Determination of active TGF-beta2 in aqueous humor prior to and following cryopreservation. *Mol Vis.* 2006;12:1477-1482.
33. Rocha Junior AM, Vieira BJ, Andrade LCF, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:303-307.
34. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg.* 1994;220:10-18.
35. Raghov R. Role of transforming growth factor-beta in repair and fibrosis. *Chest.* 1991;99:61S-65S.
36. Nishimura SL. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. *Am J Pathol.* 2009;175:1362-1370.
37. Yoon BS, Moon JH, Jun EK, Kim J, Maeng I, Kim JS, et al. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19:887-902.
38. Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011;121:233- 251.
39. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.
40. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-791.
41. Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor-b. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed. New York: Plenum, 1996: pp. 275-308.
42. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci.* 1994;107 ( Pt 5):1137-1157.
43. Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG, et al. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *Am J Pathol.* 2001;159:2147-2157.
44. Amendt C, Mann A, Schirmacher P, Blessing M. Resistance of keratinocytes to TGFbeta-mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates reepithelialization in skin wounds. *J Cell Sci.* 2002;115:2189-2198.

45. Rocha Júnior 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;6:258-266.
46. Oliveira RG, Aarestrup FM, Miranda C, Vieira BJ, Ferreira AP, Andrade LC. Low level laser therapy reduces delayed hypersensitivity reaction to ovalbumin in Balb/C mice. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:773-777.
47. Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med*. 2004;35:84-89.
48. Feril Junior LB, Tachibana K, Ogawa K, Yamaguchi K, Solano IG, Irie Y. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. *J Med Ultrasonics*. 2008;35:153-160.
49. Altomare M, Nascimento AP, Romana-Souza B, Amadeu TP, Monte-Alto-Costa A. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. *Wound Repair Regen*. 2009;17:825-831.
50. Sobanko JF, Alster TS. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. *Dermatol Surg*. 2008;34:991-1000.
51. Damante CA, Marques VMM, De Micheli G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura. *RFO*. 2008;13:88-93.
52. Pinto NC, Pereira MH, Stolf NA, Chavantes MC. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: therapeutic proposal. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24:88- 91.
53. Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. *An Bras Dermatol*. 2006;81:150-156.
54. Bayat M, Azari A, Golmohammadi MG. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:465-470.
55. Gonçalves WL, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JG, et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:877-884.
56. Busnardo VL, Biondo-Simões MLP. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. *Rev Bras Fisioter*. 2010;14:p. 45-51.
57. Helayel PE, Conceição DB, Oliveira Filho GR. Bloqueios nervosos guiados por ultra-som. *Rev Bras Anestesiol*. 2007;57:106-123.

58. Olsson DC, Martins VMV, Pippi N L, Mazzanti A, Tognoli GK. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Ciê n Rural*. 2008;38:1199-1207.
59. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther*. 2001;81:1351-1358.
60. Emsen IM. The effect of ultrasound on flap survival: an experimental study in rats. *Burns*. 2007;33:369-371.
61. Ennis WJ, Lee C, Meneses P. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. *Clin Dermatol*. 2007;25:63-72.
62. de Bem DM, Maciel CD, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. *Rev Bras Fisioter*. 2010;14:114-120.
63. Freitas TP, Gomes M, Fraga DB, Freitas LS, Rezin GT, Santos PM, et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. *J Surg Res*. 2010;161:168-171.
64. Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. *J Orthop Res*. 2006;24:1310-1316.
65. Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials*. 2003;24:2379.

## APÊNDICE 2



**Effects of low level laser and therapeutic ultrasound on tissue repair in wistar rats: histopathological study and TGF $\beta$ <sub>1</sub> expression**

Journal: *Wound Repair and Regeneration*  
 Manuscript ID: Draft WRR-12-07-0244  
 Manuscript Type: Original Research-Regeneration Science  
 Date Submitted by the Author: 30/07/2012

**Wound Repair and Regeneration**

**Manuscript under review - CONFIDENTIAL**

EFFECTS OF LOW LEVEL LASER AND THERAPEUTIC ULTRASOUND ON TISSUE REPAIR IN WISTAR RATS: HISTOPATHOLOGICAL STUDY AND TGF $\beta$ <sub>1</sub> EXPRESSION

Karine H. de S. Lopes\* Fernando M. Aarestrup\*\* Beatriz J. V. Aarestrup \*\*\*

\* Physical therapist. Graduate student. Masters degree in Health. Federal University of Juiz de Fora/MG, Brazil. \*\* MD. DDS. PhD in Pathology. School of Dentistry - Federal University of Juiz de Fora /MG, Brazil. \*\*\* DDS. PhD in Pathology. Morphology/Histology Department. Institute for Biological Sciences. Federal University of Juiz de Fora /MG, Brazil.

Immunopathology and Experimental Pathology Laboratory. Federal University of Juiz de Fora /MG, Brazil.

Corresponding author and author to whom requests for reprints should be addressed: Beatriz J. V. Aarestrup. Campus Universitario UFJF – ICB, s/n, Martelos, Juiz de Fora/MG, Brasil. +55-032-21023212. beatrizaarestrup@gmail.com

Running title: Effects of LLLT and UST on tissue repair in rats.

Keywords: Repair. Skin wound. Laser therapy. Therapeutic ultrasound.

Transforming growth factor- $\beta$ .

Authorship Standards: Each person listed as an author has participated in the study to a significant extent. The authors accept full responsibility for the design and conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.

## ABSTRACT

Low level laser therapy and therapeutic ultrasound have been demonstrated to be options for healing modulation, but the mechanisms of action involved in these processes are not clear. The effects of laser therapy and therapeutic ultrasound on surgical skin wounds in Wistar rats were evaluated. On the tenth day, the wounds were photographed and measured, and after being excised at the moment of euthanasia, they were processed for histopathological evaluation to assess the density and organization of collagen fibers. In addition, histomorphometric evaluations were conducted to quantify angiogenesis and inflammatory infiltrates, and immunohistochemistry was performed to assess TGF $\beta$ <sub>1</sub> expression. The samples from the treated groups had a more mature macroscopic appearance compared to the control group, with no significant difference in wound closure. Microscopically, the results suggested that the laser therapy had a better immunomodulatory effect when used alone and that the therapeutic ultrasound showed a higher angiogenic potential. The immunohistochemical evaluation revealed that most of the inflammatory cells in the scar area did not express TGF $\beta$ <sub>1</sub>. The results suggest that, although laser therapy and ultrasound act directly on reducing the inflammatory infiltrate, their concurrent use does not enhance the effect that is observed when they are applied individually.

## INTRODUCTION

Adjuvant therapies such as low level laser therapy (LLLT) and therapeutic ultrasound (TUS) have been demonstrated to be options for the modulation of physiopathological mechanisms that result in an enhanced quality of the newly formed tissue and a shorter total time of healing.

The low level laser has photo- and physicochemical properties in which the laser light acts at a biomolecular level, promoting anti-inflammatory and analgesic effects and accelerating wound healing. Several studies suggest that these effects occur through an increase in cell proliferation and metabolism associated with increased DNA synthesis, growth factor synthesis and reduced prostaglandin production. (1)

In addition to LLLT, Therapeutic US is an auxiliary resource for enhancing the healing process. Its effects include the stimulation of chemotaxis, increased fibroblast and endothelial proliferation and increased synthesis of growth factors and collagen.(2)

In all of these phenomena, the effect of the treatment is based on increased cell membrane permeability (3). The effect of Therapeutic US on collagen synthesis and immunomodulation was studied by Tsai et al. (4) in tendon lesions, by Li et al. (5) in osteoblast cultures and by Maeshige et al. (6) in fibroblast cultures. These studies and others suggest that the described effects are mediated by the expression of different transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) isoforms (1).

The TGF- $\beta$  superfamily includes the TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms; BMP (bone morphogenetic proteins); activins; and inhibins (7-9). TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 were demonstrated to be immunosuppressive cytokines by Kobie et al. (8) and Gomez and Kruse (7), in addition to their different roles in the healing process.

TGF- $\beta$ 2, which has been extensively studied, influences mononuclear leukocyte differentiation, stimulates fibroblast proliferation and inhibits extracellular matrix degradation proteases (10, 11).

TGF- $\beta$ 1 upregulates protease and integrin transcription; stimulates collagen synthesis in the matrix; stimulates myofibroblast differentiation, which leads to the contraction of lesion edges; and stimulates angiogenesis (12). Amendt et al. (13) suggest that TGF- $\beta$ 1 expression is associated with the increased proliferation and decreased apoptosis of keratinocytes. It is interesting to note that the serum levels of TGF $\beta$ 1 are lower in diabetic patients who have venous ulcers (14).

Considering the use of Therapeutic US in the clinical setting to enhance pressure ulcer healing and the healing of other wounds such as tendon and bone lesions (6) and the use of LLLT to accelerate the closure of skin and mucous membrane ulcers (14), it is important to understand the immunological events and histopathological factors involved with skin repair. In addition, it is important to understand the mechanisms of action of auxiliary therapies on the inflammatory process to support the establishment of treatment protocols for modulating the healing process, reducing repair time and improving scar tissue quality.

The objective of this study was to compare the effects of LLLT and Therapeutic US, alone and in combination, on the granulation tissue and on TGF- $\beta$ 1 expression during the tissue repair process of surgical skin wounds in Wistar rats. To date, no studies have been published showing the effect of the combination of these techniques as assessed in this study.

## **METHODS**

All animal procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (Comissao de Etica na Experimentacao Animal - CEEA), Pro-Reitoria de Pesquisa /UFJF (Protocol # 034/2009).

### **Rat wound models**

The dorsal region of Wistar rats (n=24, male *Rattus norvegicus*, aged 7 weeks, average weight of 200 g) was trichotomized under anesthesia (ketamine 100 mg/Kg + xylazine 10 mg/Kg). After local asepsis (2% alcoholic iodine), the skin tissue fragment was sectioned according to the previous definition of the area. The animals were subsequently divided into groups: GI (n=6), control, subjected to contact with turned-off devices (*sham*); GII (n=6), subjected to LLLT; GIII (n=6), treated with US; and GIV (n=6), treated simultaneously with LLLT and US.

### **Laser therapy protocol**

The first LLLT application, isolated or combined with Therapeutic US, was performed 2 h after the surgery. The second application was performed 48 h after the procedure, and the last was performed seven days after the lesion. Therapeutic US was applied every two days. The first application was 2 h after the surgical lesion, and

the last application was given on the ninth day of treatment. In group IV, Therapeutic US was performed after the LLLT application so that it would not interfere with laser absorption. The device used for LLLT was the MMOPTICS (Sao Carlos, Brazil), model Twin Laser, which was equipped with an infrared emission laser and used with pulsatile signals, 780 nm wavelength, 70 mW peak power (average output power between 0.5 and 3.5 mW) and application through fiber-optic sweeping at the central area of the wound, 15 mW power, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose and 15 s of application.

### **Therapeutic ultrasound application protocol**

The device used for Therapeutic US treatment was an IBRAMED (Amparo, Brazil), Sonopulse Compact model, which was used in pulsed mode with a 1 MHz frequency, 0.4 W/cm<sup>2</sup> intensity and 3 min of application. Water-based gel was used as the conductive agent.

### **Macroscopic monitoring of the wound**

The healing process was monitored by photography using a Sony DSC-W380 digital camera. The camera was attached to a tripod and kept at a standardized distance from the animals. The photos were taken immediately after surgery and every two days, until the tenth day.

To evaluate the closure of wounds, the wound area were registered *in loco* on the first and last day of the experiment by tracing the wound on previously sterilized transparent plastic sheets. The records were digitalized, and the closure results were obtained by subtracting the initial area (IA) from the final area (FA) of the wound (AxiovisionR software, Version 4.5 for Windows).

### **Collection of skin samples**

One day after the last day of treatment, the animals were euthanized by anesthetic overdose (ketamine 100 mg/Kg and xylazine 10 mg/Kg).

The surgical wound was excised, including the adjacent skin and the deep scar tissue. The samples were fixed in buffered formalin at 10% and subjected to routine histological processing, embedded in paraffin blocks and sectioned on a microtome (5- $\mu$ m sections). After they were prepared, sections corresponding to each sample were selected for routine staining in hematoxylin and eosin and for immunohistochemical processing.

## Histopathological, histomorphometric and immunohistochemical analysis

The slides were thoroughly analyzed with a Zeiss microscope (Hallbergmoos, Germany) by two different observers with experience and training in histopathology to evaluate the density and organization of collagenous fibers and the general characteristics of the other granulation tissue components.

Histomorphometry (AxiovisionR, Version 4.5 for Windows) was performed as follows to quantify the inflammatory cells and blood vessels. Five fields (400x) per sample were selected for digital capture (Axion Vision computerized system, Zeiss, Berlin, Germany). The result is expressed as the simple arithmetic mean calculated from the counts obtained for each sample.

The immunohistochemical method used to detect TGF- $\beta_1$  expression involved the following steps: deparaffinization for 20 min (60°C) and immersion in three xylol baths for 3 min each; hydration in alcohol (100%, 95% and 70%) for 3 min each; blocking of the endogenous peroxidase (0.4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min; 100  $\mu$ L per slide); antigen retrieval in a 95°C water bath for 40 min, in PBS; and cooling for 20 min at room temperature and rinsing with PBS for 1 min. This step was followed by the addition of four drops of *Background Sniper* to the slide and a 15 min incubation (room temperature). The slides were then rinsed in PBS buffer (1 min), and the prepared slides were incubated with the primary antibody (TGF beta (V): sc-146; Santa Cruz, INC.) (Dilution 1:100  $\mu$ L) for 1 h. The slides were subsequently rinsed twice in PBS (2 min) and then incubated with a drop of the secondary antibody (*Link Universal Trekkie*) for 20 min (room temperature). The slides were rinsed twice in PBS (2 min), incubated in a humid chamber for 10 min with *TrekAvidin-HRP (Label)*—streptavidin (room temperature) and then rinsed twice in PBS (2 min each). The slides were then incubated with one drop of *Betazoid DAB Chromogen* (DAB) homogenized in 1 mL of PBS (5 min). They were then rinsed twice in distilled water and in PBS and then counterstained with hematoxylin (1 min). Finally, the slides were rinsed in distilled water and then twice in PBS (1 min each) and dehydrated in three alcohol baths 100% (1 min each) followed by three xylol baths (1 min each). The slides were then prepared. The negative control was produced by omitting the primary antibody in a selected slide. Positive results were defined by the presence of brown cytoplasmic staining visible under a light microscope.

Two different observers with experience and training in histopathology analyzed the slides subjected to immunohistochemistry. Five fields (400x, Zeiss light microscope, Hallbergmoss, Germany) were selected for digital capture (Axion Vision, Zeiss, Berlin, Germany) after the evaluation of the entire slide. The results are expressed as the simple arithmetic mean calculated from the counts obtained in each sample.

### **Statistical analysis**

We used one-way ANOVA for statistical analysis, followed by Tukey's test to verify the significant differences between groups. GraphPad InStat software (San Diego, CA), version 3.0 was used for these analyses. The results are expressed as the average  $\pm$  standard deviation. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Macroscopic monitoring of the wound**

On the last day of the experiment, the skin wounds of the animals in the control groups had bloody edges, intensively erythematous surfaces and were partially covered by non-reabsorbed blood clots (Figure 1A). The wounds of group II (LLLT) had less erythematous coloring compared to the control group, and the edges were partially covered by crust (Figure 1B). The scar area of the group III wounds (US) had welldefined healed edges but had bulky, soft and highly erythematous granulation tissue in the central area of the wound (Figure 1C). The healing area in Group IV (LLLT + US) had a firm consistency, well-defined edges, a central region with coloring similar to mature tissues and a re-epithelialized surface (Figure 1D).

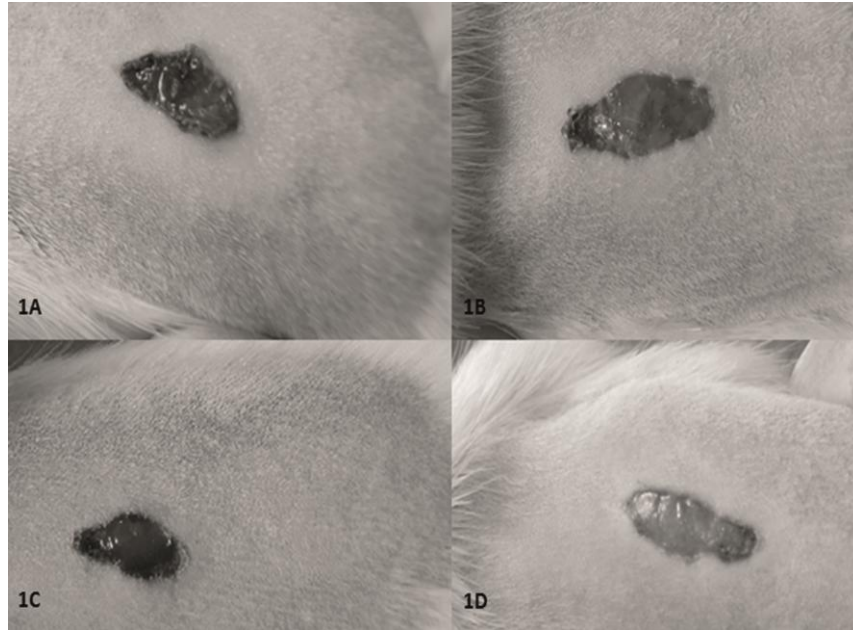
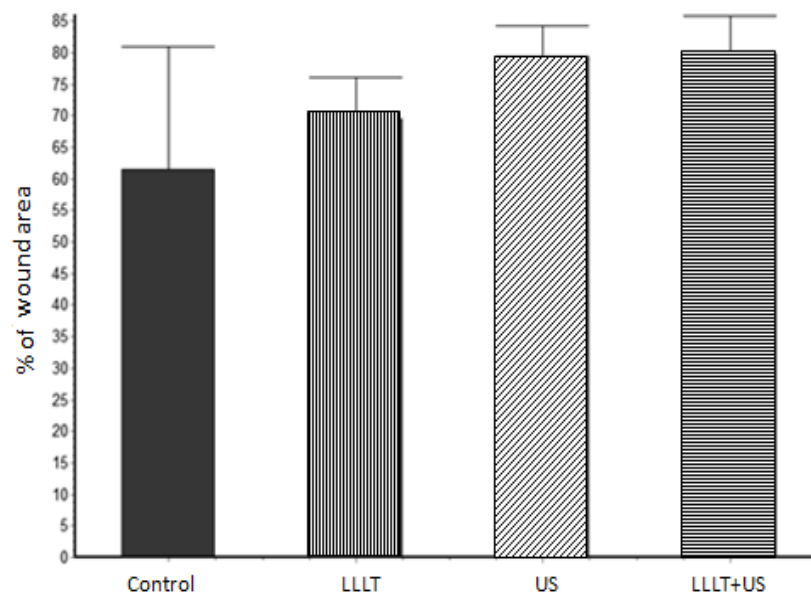


Figure 1: Macroscopic analysis. (1A) Control group. (1B) Group II: LLLT. (1C) Group III: US. (1D) Group IV: LLLT+US.

Despite the macroscopic differences in the healing areas, there were no statistically significant differences for wound closure (IA-FA) ( $p < 0.05$ ) (Graphic 1).



Graphic 1: Wound closure area. Results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0,05$ ).



### Histopathological, histomorphometric and immunohistochemical analyses

The granulation tissue from the control group samples exhibited the typical characteristics of intense fibroblast cellularity, mixed inflammatory infiltrate with mononuclear prevalence and edema among loose and disorganized collagen fibers, with proportional angiogenesis. The extracellular matrix of the samples from groups II (LLLT) and III (US) had more dense and organized collagen fibers compared to the control group; the samples from group IV (LLLT + US) had more organized collagen fibers but were more delicate when compared to the samples treated with LLLT and US individually (Figure 2).

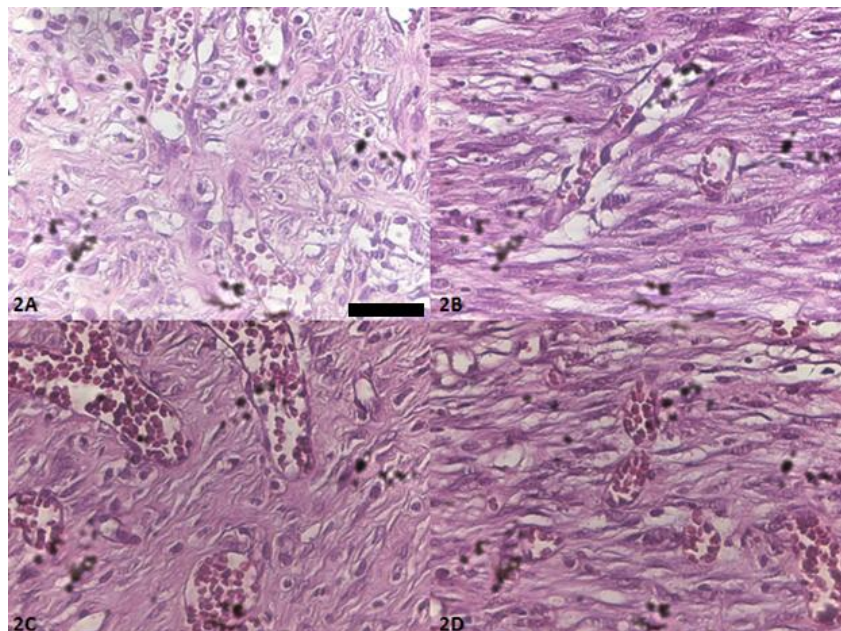
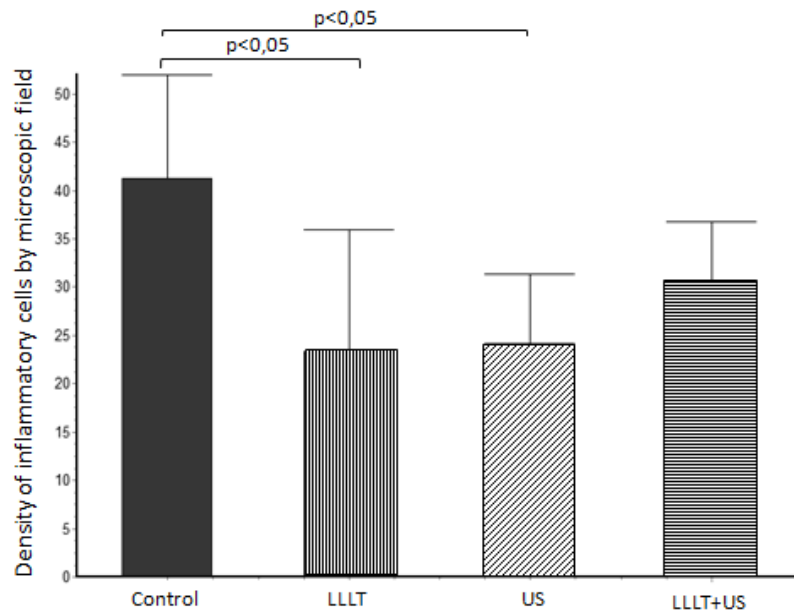


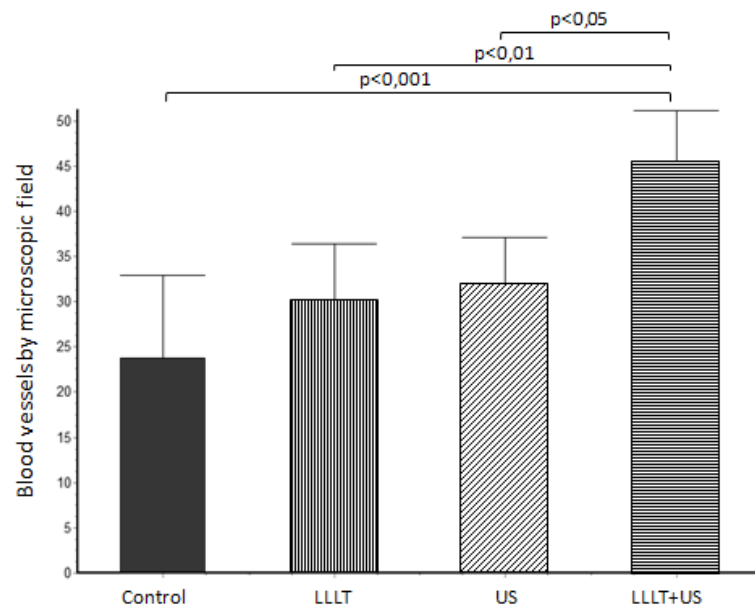
Figure 2: Histopathological analysis. (2A) Control group. (2B) Group II: LLLT. (2C) Group III: US. (2D) Group IV: LLLT+US. Original magnification 400X. Hematoxylin and eosin. Scale bar (50  $\mu$ m) is indicated.

The density of the inflammatory infiltrate was lower in the samples from groups II (LLLT) and III (US) than in the samples from group I (control) ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences between the samples from group IV (LLLT + US) compared to the other groups ( $p < 0.05$ ) (Graphic 2).



Graphic 2: Quantitative measurements of density of inflammatory cells by microscopic field. Results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0,05$ ).

The amount of blood vessels per microscopic field was significantly higher in group IV (LLLT + US) compared to the other groups ( $p < 0.05$ ) (Graphic 3).



Graphic 3: Quantitative measurements of the blood vessels by microscopic field. Results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0,05$ ).

TGF- $\beta$ 1 expression in the connective tissue from the group IV samples (LLLT + US) ( $p < 0.05$ ) was not statistically significant from that of the samples from group I (control). However, a significant difference was observed when the group IV samples

(LLLT + US) was compared with group II (LLLT) and group III (US) ( $p < 0.05$ ) (Figure 3), (Graphic 4).

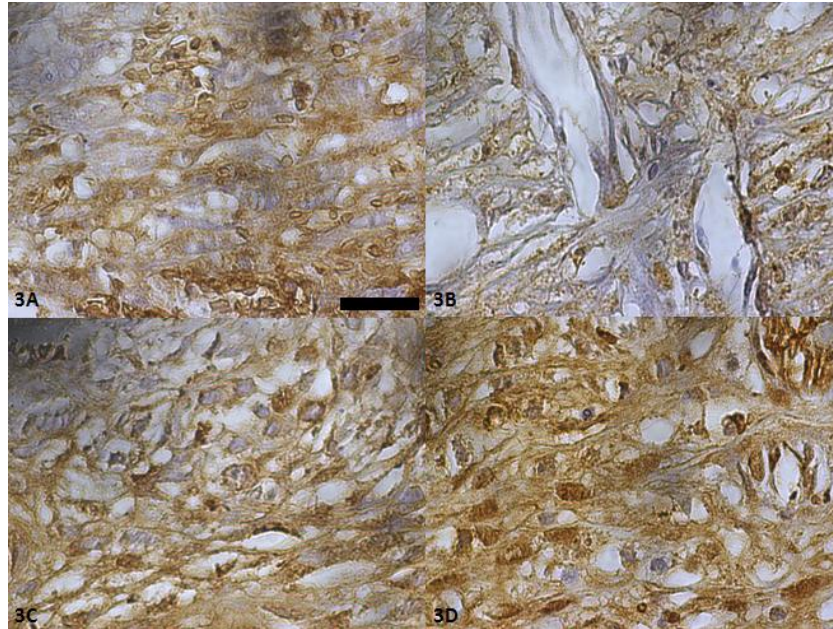
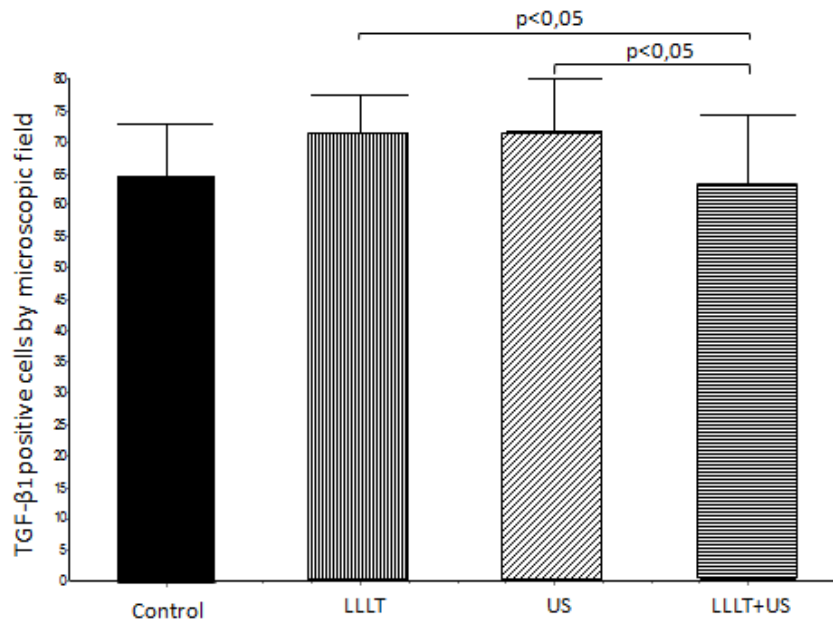


Figure 3: Expression of TGF $\beta$ 1. (3A) Control group. (3B) Group II: LLLT. (3C) Group III: US. (3D) Group IV: LLLT+US. Original magnification 400X. Immunohistochemistry stain. Scale bar (50  $\mu$ m) is indicated.



Graphic 4: Expression of TGF $\beta$ 1 positive cells by microscopic field. Results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

A previous study by our laboratory in which we utilized a model of surgical skin wounds in *Wistar* rats treated with LLLT (780 nm, 70 mW peak power; average output power between 0.5 and 3.5 mW, 15 mW power, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose, 15 s of application) found a correlation between the increased number of fibroblasts and a higher apoptosis rate of epithelial cells in the skin coating when evaluated using the TUNEL method in comparison to untreated samples, and this correlation was associated with higher TGF $\beta$ 2 expression in connective tissue cells (15). These results suggest that LLLT induces epithelial apoptosis during repair because it increases cell proliferation, proportionally increases keratinocyte turnover and has an immunomodulatory effect associated with the expression of TGF $\beta$ 2.

More recently, we have also demonstrated the potential immunosuppressive role of laser therapy (15 mW, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose, 10 s per day) in a model of late hypersensitivity induced by ovalbumin in *Balb/C* mice. The results suggested that the immunomodulatory activity of LLLT was similar to that of azathioprine, a classic immunosuppressive drug used in transplant patients (16). In the present study, the local immunomodulatory action of LLLT was not enhanced when the technique was combined with Therapeutic US. A lower quantity of inflammatory infiltrate was observed in the samples treated with LLLT or US. The results suggest that combining the techniques did not enhance the inhibition of the anti-inflammatory effects that were observed when they are used individually.

Although several *in vitro* and *in vivo* studies have discussed the use of LLLT and US both alone and in combination, the mechanisms of action of these auxiliary therapies on the repair process and on the inflammatory components have not been completely clarified.

TGF $\beta$ 1 is another isoform of this cytokine that has been studied to try to identify the mechanism of action of LLLT. Ferrari et al. (17) found that TGF $\beta$ 1 expression is concomitantly associated with angiogenesis and the induction of apoptosis in endothelial cells. Using an experimental model of skin wounds in a hybrid transgenic mouse lineage (lineage 25). Shah et al. (18) noted that following the inhibition of serum TGF $\beta$ 1, there was a lower inflammatory response, higher deposition of extracellular matrix and decrease of late healing in skin wounds. However, the

increase in the expression of the same factor led to a lower deposition of matrix with no changes in the overall healing process.

In this study, despite lower leukocyte counts being found in samples treated with LLLT and US, individually, those populations had a larger number of TGF $\beta$ 1-positive cells; that is, the increase in the inflammatory infiltrate observed when techniques were combined was not caused by cells expressing this cytokine.

A study by Lirani-Galvão et al. (19) evaluated *Wistar* rats following tibial osteotomy and irradiation with LLLT alone (GaAIs, 30 mW, 112.5J/cm<sup>2</sup>) and US (pulsatile, 1.5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>) and found that both techniques positively influenced repair, but at different steps of the process. Therapeutic US significantly affected the clearing and demolition phase and stimulated the mononuclear population. LLLT was important at a later stage, during the deposition of new extracellular matrix. Oliveira et al. (20) found similar results in the same model. In the present study, the samples were obtained on the tenth day after the beginning of the experiment, and this timing could be a determining factor in the evaluation of the results.

Wood et al. (21) demonstrated in an experimental model of traumatic lesions in rat tendons that samples treated with LLLT (GaAIs, 830 nm, 40 mW, 1.4 W/cm<sup>2</sup>, 0.12 J), with US (3 MHz, pulsatile, 1.0 W/cm<sup>2</sup>) and with both techniques combined presented a higher level of type-I collagen synthesis compared to the untreated control group. Qualitatively, although the samples treated with US alone had more organized fibers compared to the others, there was no significant difference between the treated groups. Similar results were previously noted by Demir et al. (22), whose experiment showed that type-I collagen deposition in traumatic lesions induced in rat tendons was higher in samples treated with LLLT, US or LLLT combined with US in comparison to the untreated group but that there were no significant differences between the techniques when used individually or together.

The macroscopic, histopathological and immunohistochemical analyses in this study showed similar results, and macroscopically, the wounds of the treated groups showed more evident maturing and more mature and organized granulation tissue associated with lower TGF $\beta$ 1 expression when compared to the control group.

In the present study, the treatment of the wounds with the combined techniques enhanced the vascularization of granulation tissue. These data suggest that although LLLT is associated with lower inflammatory cell density, the angiogenic stimulation

induced by US increased the inflammatory infiltrate in the scar tissue area when the techniques were combined.

The results of this study suggest that although LLLT and US act directly on reducing inflammation, their concurrent use does not enhance the effect that is observed when they are applied individually.

**Acknowledgments:** FAPEMIG Financial support – “First Projects Programs” (Programa Primeiros Projetos), Process #: APQ-04368-10.

## References

1. Zhong HL, Wang ZM, Yang ZJ, Zhao F, Wang B, Wang ZC, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$ 1 on the healing of reconstructed dura by carbon dioxide laser soldering in minipigs. *Chin Med J (Engl)* 2012;125(4):611-6.
2. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther* 2001;81(7):1351-8.
3. Feril Junior LB, Tachibana K, Ogawa K, Yamaguchi K, Solano IG, Irie Y. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. *J Med Ultrasonics*, 2008 jun: 35 (4):153–60.
4. Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. *J Orthop Res* 2006;24(6):1310-6.
5. Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003;24(13):2379-85.
6. Maeshige N, Terashi H, Aoyama M, Torii K, Sugimoto M, Usami M. Effect of ultrasound irradiation on  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expression in human dermal fibroblasts. *Kobe J Med Sci* 2011;56(6):E242-52.
7. Gomez GG, Kruse CA. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol* 2006;10(A):133-46.
8. Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, et al. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 2003;63(8):1860-4.
9. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83(3):835-70.

10. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg* 1994;220(1):10-8.
11. Sporn MB, Roberts AB. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J Clin Invest* 1993;92(6):2565-6.
12. Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, Zhang X, Valacca C, Poggio P, Pintucci G, Mignatti P. TGF- $\beta$ 1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38 $\beta$  to proapoptotic p38 $\alpha$ . *Mol Cancer Res*. 2012 May;10(5):605-14. Epub 2012 Apr 20.
13. Amendt C, Mann A, Schirmacher P, Blessing M. Resistance of keratinocytes to TGFbeta-mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 10):2189-98.
14. Cowin AJ, Hatzirodos N, Holding CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE, et al. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2001;117(5):1282-9.
15. Rocha Júnior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg* 2009;27(2):303-7.
16. de Oliveira RG, Aarestrup FM, Miranda C, Vieira BJ, Ferreira AP, Andrade LC. Low-level laser therapy reduces delayed hypersensitivity reaction to ovalbumin in Balb/C mice. *Photomed Laser Surg* 2010;28(6):773-7.
17. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol* 2009;219(2):449-58.



18. Shah M, Revis D, Herrick S, Baillie R, Thorgeirson S, Ferguson M, et al. Role of elevated plasma transforming growth factor-beta1 levels in wound healing. *Am J Pathol* 1999;154(4):1115-24.
19. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg* 2006;24(6):735-40.
20. Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FA, Nonaka KO, Renno AC. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter* 2011;15(3):200-5.
21. Wood VT, Pinfieldi CE, Neves MA, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med* 2010;42(6):559-65.
22. Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med* 2004;35(1):84-9.