

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CRISTIANO DE LOURA SANTANA

**Influência de dois regimes de entrega do laser em baixa
intensidade no reparo cutâneo de ratos diabéticos - avaliação do
infiltrado inflamatório**

São Paulo – SP

2013

CRISTIANO DE LOURA SANTANA

Influência de dois regimes de entrega do laser em baixa intensidade no reparo cutâneo de ratos diabéticos - avaliação do infiltrado inflamatório

**Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre em Biofotônica**

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Miranda
França

**São Paulo
Novembro / 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana, Cristiano de Loura.

Influência de dois regimes de entrega do laser em baixa intensidade no reparo cutâneo de ratos diabéticos: avaliação do infiltrado inflamatório. / Cristiano de Loura Santana. 2013.

67 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo. 2013.

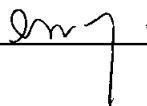
São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): CRISTIANO DE LOURA SANTANA

Título da Dissertação: "Influência de dois regimes de entrega do laser em baixa intensidade no reparo cutâneo de ratos diabéticos – avaliação do infiltrado inflamatório"

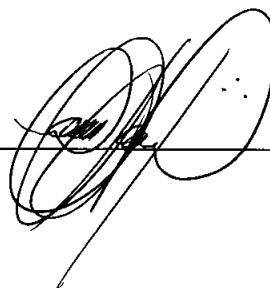
Presidente: PROFA. DRA. CRISTIANE MIRANDA FRANÇA



Membro: PROFA. DRA. SILVIA CRISTINA NUNEZ



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILO DE CARVALHO



DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família que me deu muito apoio em todos os momentos da minha vida, ao meu noivo que esteve ao meu lado, que nunca mediu esforços para me ajudar sempre com um sorriso brilhante, à minha querida professora orientadora, pela confiança, amizade e segurança, aos meus amigos do laboratório que sempre me deram suporte, à UNINOVE, pela oportunidade de crescer profissionalmente, aos professores que me ensinaram com toda a dedicação e, sobretudo aos mais queridos alunos de iniciação científica, um obrigado mais do que especial, vocês são a diferença!

Obrigado por tudo!

RESUMO

O reparo tecidual dos diabéticos é alterado e muitas vezes ineficiente levando a complicações pós-cirúrgicas importantes, como retardo no reparo, deiscência e infecção. A laserterapia é uma ferramenta promissora para auxiliar o fechamento destas feridas, porém a falta de padronização da dosimetria, dos regimes de entrega de energia e falta de entendimento dos seus mecanismos celulares e moleculares de ação limitam a disseminação do seu uso. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o reparo tecidual de lesões cutâneas de animais diabéticos submetidos a dois regimes de entrega de luz laser, a saber: dose única e dose fracionada. Foram utilizadas 54 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com diabetes induzido por injeção intraperitoneal de Streptozotocina (50mg/kg). A úlcera foi realizada com *punch* de 8 mm no dorso do animal após tricotomia. Grupos experimentais: (1) grupo controle (GC) - a úlcera dorsal não foi submetida a tratamento; (2) dose única (GU) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia duas horas após a realização da ferida; (3) dose fracionada (GF) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia nos dias 1, 3, 8 e 10. Os parâmetros da aplicação do laser no grupo GU foram: $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, $P = 30$ mW, área do feixe: $0,785 \text{ cm}^2$, $D = 4 \text{ J/cm}^2$, $t = 104$ s; e no grupo GF foram quatro aplicações de $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, $P = 30$ mW, $D = 1 \text{ J/cm}^2$, área: $0,785 \text{ cm}^2$, $t = 26$ s totalizando um tratamento de 4 J/cm^2 . As úlceras foram fotografadas e três animais de cada grupo sofreram eutanásia, as úlceras foram removidas, processadas rotineiramente para coloração de hematoxilina e eosina e imunohistoquímica para detecção de neutrófilos, linfócitos, linfócitos T ativados, macrófagos e células da linhagem angiogênica. Quando comparadas ao grupo controle, as duas formas de entrega de energia se mostraram eficazes no tratamento de lesões cutâneas nos modelos experimentais utilizados. O grupo dose única apresentou maior aceleração na ativação do sistema imunológico e mais rapidez na cicatrização, porém com maior intensidade de deposição de colágeno ocasionando fibrose. O grupo dose fracionada apresentou desde o início tendência de resposta inflamatória modulada, sem picos e a cicatrização ocorreu de forma mais lenta, no entanto a deposição de colágeno foi menor proporcionando uma cicatriz com maior qualidade.

Palavras chave: Diabetes Mellitus, fotônica, cicatrização, inflamação, reparo

ABSTRACT

The tissue repair of diabetics is changed and often inefficient, leading to the post surgical complications, dehiscence and infection. Lasertherapy is a promising tool to assist the closure of these wounds, but the lack of standardization of dosimetry, energy delivery systems and lack of understanding of the cellular and molecular mechanisms of action limited the spread of its use. Thus, the objective of this work is to evaluate the tissue repair of cutaneous lesions of diabetic animals subjected to two schemes of laser light delivery, namely: single dose and dose fractionation. 54 Wistar rats were used (*Rattus norvegicus albinus*) with diabetes induced by intraperitoneal injection of Streptozotocina (50 mg/kg). The ulcer was held with *punch* of 8 mm on the back of the animal after shaving. Experimental groups: (1) control group (GC)-dorsal ulcer is not treatment; (2) single dose (GU)-dorsal ulcer received laser therapy two hours after the completion of the wound; (3) fractionated dose (GF)-dorsal ulcer received laser in days 1, 3, 8 and 10. The parameters of the laser application on GU group were: $\lambda = (660 \pm 2) \text{ nm}$, $P = 30 \text{ mW}$, $D = 4 \text{ J/cm}^2$, spot area of $0,785 \text{ cm}^2$, $t = 104 \text{ s}$; and the Group GF were four applications of $\lambda = (660 \pm 2) \text{ nm}$, $P = 30 \text{ mW}$, $D = 1 \text{ J/cm}^2$, spot area of $0,785 \text{ cm}^2$, $t = 26 \text{ s}$ totaling 4 J/cm^2 . The ulcers were photographed and three animals in each group were submitted to euthanasia, the ulcers were removed, processed routinely for hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry for the detection of neutrophils, lymphocytes, macrophages and activated T cells of the angiogenic lineage. When compared to the control group, the two forms of energy delivery proved effective in the treatment of cutaneous lesions in experimental models used. The single-dose group showed the highest acceleration in immune system activation and faster wound healing, but with greater intensity of collagen deposition causing fibrosis. The fractional dose group showed from the start trend of modulated inflammatory response, without peaks and the healing occurred more slowly, however collagen deposition was lower providing a scar with higher quality.

Key words: Diabetes Mellitus, photonics, wound healing, inflammation, repair

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Reparo tecidual.....	15
2.2. Diabetes e reparo.....	17
2.3. Uso do laser em baixa intensidade.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais e grupos experimentais.....	23
4.2. Indução do diabetes.....	24
4.3. Procedimentos cirúrgicos – indução da úlcera.....	24
4.4. Laserterapia.....	25
4.5. Análise do fechamento da ferida.....	25
4.6. Análise histológica.....	27
4.7. Imunohistoquímica para marcadores celulares e citocinas.....	27
4.8. Contagem celular.....	29
4.9 Análise dos resultados.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Artigo 1 – enviado para publicação – The Scientific World Journal.....	30
5.2. Artigo 2 – em preparao para ser enviado ao Journal of Investigative Dermatology...45	45
5.3. Resultados não publicados.....	60
5.3.1. Anticorpo anti-CD31.....	60
5.3.2. Anticorpo anti-elastase.....	61

5.3.3. Anticorpo anti-CD45ro.....	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
7. BIBLIOGRAFIA.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho do estudo.....	26
Figura 2: Marcação para linfócitos T ativados.....	50
Figura 3: Contagem para marcadores Anti-CD68.....	51
Figura 4: Contagem para marcadores Anti-CD31.....	60
Figura 5: Contagem para marcadores Anti-Elastase.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados e especificações.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Trifosfato de adenosina
DM	Diabetes mellitus
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
Ga-As	Arsenieto de Gálio
GC	Grupo controle
GF	Grupo dose fracionada
GU	Grupo dose única
HARP	Peptídeo regulador de afinidade da heparina
He-Ne	Helio Neônio
IFN	Interferon
IL	Interleucina
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LBI	Laser de baixa intensidade
LLLT	Low level laser therapy
mW	Miliwatt
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
TGF	Fator de transformação de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia associada à complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos e que pode ser resultado de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta pancreáticas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (SAÚDE, 2006).

A Organização Mundial de Saúde estima que o número de portadores do diabetes mellitus (DM) em todo o mundo seja de 347 milhões em 2013, com expectativa de alcançar o sétimo lugar no ranking de causa de mortes. No Brasil foram contabilizados cerca de doze milhões de portadores 2010. (OMS)

Um indicador macroeconômico a ser considerado é que o diabetes cresce mais rapidamente em países pobres e em desenvolvimento. Isso impacta a economia de forma muito negativa devido à morbimortalidade precoce, que atinge pessoas ainda em plena vida produtiva, onera a previdência social e contribui para a continuidade do ciclo vicioso da pobreza e da exclusão social com projeção de 300 milhões em 2030 devido ao crescimento populacional, sobrevivência do paciente, sedentarismo e obesidade (SAÚDE, 2006).

O diabetes resulta em dificuldade no fechamento de feridas pós-cirúrgicas, sequelas incapacitantes como cegueira, insuficiência renal crônica e/ou feridas crônicas que levam à amputação de membros inferiores (REPÁRAZ et al, 2004). O pé diabético representa uma das mais importantes complicações crônicas do DM e afeta 15% dos diabéticos. A ulceração nos pés causa considerável morbidade originando frequentes internações e a amputação dos pés ou pernas é a consequência mais temida, entre 40% e 60% das amputações não traumáticas das extremidades inferiores ocorrem em pacientes diabéticos e 85% destas amputações vêm precedidas de uma úlcera na pele .(REPÁRAZ et al, 2004; CARVALHO et al, 2004)

Por isso, o diabético representa também carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura. Mundialmente, os custos diretos para o atendimento ao diabéticos variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais em saúde, dependendo da prevalência local da doença e da complexidade do tratamento disponível. Além dos custos financeiros, o diabetes acarreta também outros custos associados à dor, ansiedade, inconveniência e menor qualidade de vida que afeta tanto os doentes quanto suas famílias (TOSCANO et al, 2004)

A terapia com laser de baixa intensidade (do inglês *low level lasertherapy* - LLLT) é a aplicação de luz (normalmente um laser de baixa energia ou diodo emissor de luz no intervalo de 1 mW - 500 mW) a uma patologia para promover a regeneração dos tecidos, reduzir a inflamação e aliviar a dor. A luz é tipicamente de largura espectral na faixa do infravermelho vermelho ou próximo espectro (600 nm - 1000 nm), com uma densidade de potência (irradiância) entre 1mw-5W/cm².(HAMBLIN et al, 2009)

As mitocôndrias são consideradas geradores de energia da célula eucariótica, convertendo oxigênio e nutrientes através do processo de fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte eletrônico em adenosina trifosfato (ATP). A idéia básica por trás da respiração celular é que elétrons de alta energia são passados de carreadores de elétrons, tais como redução nicotinamida adenina dinucleotídio (NADH) e a forma reduzida de dinucleotido de flavina e adenina (FADH₂), através de uma série de complexos transmembranosos (incluindo o citocromo C oxidase) para o receptor final de elétrons, gerando um gradiente de prótons. O gradiente é usado por FOF1 ATP sintetase para produzir ATP (HASHMI et al, 2010).

Segundo CHOW (2009), o laser em baixa intensidade é constituído por feixes coerentes de comprimentos de onda e que pode ser emitido de modo contínuo ou pulsado e que utiliza a energia da luz para modular a fisiologia celular e de tecidos para atingir benefício terapêutico sem maior aumento de temperatura, é não invasivo, indolor e pode ser facilmente administrado nos primeiros socorros. HASHMI et al (2010) verificaram que a Irradiação laser causou um aumento em produtos mitocondriais como o ATP, NADH, proteína, ácido ribonucleico) e um recíproco aumento no consumo de oxigênio. .

O laser em baixa intensidade tem sido reconhecido pelos seus efeitos bioestimulatórios em diversas situações clínicas, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al, 1975).

Nos pacientes diabéticos a laserterapia acelera o fechamento das feridas traumáticas, cirúrgicas e úlceras crônicas, mesmo em presença de níveis elevados de glicemia. Os mecanismos pelos quais o laser promove este efeito ainda estão pouco estabelecidos (KAVIANI et al, 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparo tecidual

A cicatrização de feridas é caracterizada por uma série coordenada e progressiva de eventos concebidos para restaurar a função da barreira e integridades mecânicas da pele, envolvendo mediadores, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimais que são divididos em três fases: inflamação, reparo e remodelação (GURTNER et al, 2008; CLARK, 1995).

O dano vascular leva ao extravasamento de componentes sanguíneos e à exposição e proteínas da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, proteína matricelular e trombospondina-1 (GURTNER, et al, 2008; CLARK, 1995; MENDONÇA et al, 2009).

Após a lesão celular, ocorre a ativação da cascata de coagulação e do complemento a liberação dos fatores de crescimento e ativação de células parenquimatosas acarretando a produção de numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias no local da ferida (CLARK, 1995).

As plaquetas secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento

transformante- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante- α (TGF- α) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), fatores quimiotáticos para neutrófilos e glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina (MENDONÇA et al, 2009).

Após a saída das plaquetas de dentro do leito vascular, neutrófilos e monócitos, em resposta aos agentes quimiotáticos, migram em direção ao leito da ferida (CLARK, 1995).

Os monócitos do sangue periférico, em todo o processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, também para a ativação sua ativação, transformando-os em macrófagos (MENDONÇA et al, 2009).

O macrófago ativado é a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, secreta fatores quimiotáticos que e produzem prostaglandinas, que são vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos (CLARK, 1995; EMING et al, 2007).

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito. Compreende: a reepitelização que tem início horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; a fibroplasia e angiogênese, compondo o tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão (MENDONÇA et al, 2009).

Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (MENDONÇA et al, 2009).

A fase de proliferação epitelial, no epitélio, inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF- α e EGF, onde também ocorre a formação do tecido de granulação (FRADE et al, 2003).

A fibroplasia é um mecanismo que envolve a proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da ferida por estímulo de fatores de crescimento como PDGF,

fator básico de crescimento de fibroblasto (FGF) e TGF β que, semelhantes às células epiteliais, migram para a ferida valendo-se das alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana plasmática (FRADE et al, 2003).

A angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, onde novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes e participam da formação do tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento. De forma diferencial, a vasculogênese refere-se aos primeiros estádios do desenvolvimento vascular, durante o qual as células precursoras do endotélio vascular sofrem diferenciação, expansão e junção para formar a rede de túbulos primitivos do organismo (MENDONÇA et al, 2009).

Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogenese como o FGF, EGF, TGF α , PDGF, TGF β , VEGF, fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF) e peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD, 1991, BELPERIO et al, 2000; FRADE et al, 2003).

A fase de reparo é uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal onde há equilíbrio entre a formação do colágeno novo e degradação do colágeno velho através da ação das collagenases, há o desaparecimento dos macrófagos junto com a redução da angiogenese e proliferação dos fibroblastos, ocorre a remodelação da matriz extracelular pelas metaloproteinases que incluem collagenases intersticiais, collagenase tipo IV e gelatinases tendo como principais citocinas envolvidas a interleucina 1 (IL-1), TNF α , TGF β , PDGF produzidas pelos fibroblastos e EGF e TGF β produzidas pelas células epiteliais (KARUKONDA et al, 2000).

2.2 Diabetes e reparo

No diabetes, as células especialmente afetadas pela hiperglicemia são as células endoteliais dos capilares da retina, as células mesangiais do glomérulo renal, os neurônios e as células de Schwann nos nervos periféricos. Isso se deve à incapacidade desses tipos celulares regular o transporte de glicose para o meio interno, ficando suscetíveis às

altas concentrações de glicose durante os estados hiperglicêmicos. Essas altas concentrações intracelulares de glicose, por sua vez, estimularão as vias bioquímicas responsáveis pelas alterações fisiopatológicas do diabetes, entre as quais destaca-se a via de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (BARBOSA et al, 2008).

No sentido de se determinar se o indivíduo diabético apresenta um estado pró-inflamatório associado aos níveis de glicemia sanguínea, PICCIRILLO et al (2004), estudaram um grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 sem complicações clínicas macro e microvasculares para determinar se os níveis de proteínas de fase aguda (alfa 1 glicoproteína ácida, proteína C reativa e fibrinogênio) estavam alterados e se esses níveis de proteínas de fase aguda estavam relacionados com o controle glicêmico e de acordo com os resultados obtidos, as proteínas de fase aguda, um conhecido marcador de inflamação, apresentaram-se aumentadas em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 quando comparados aos controles, independentemente do controle glicêmico

Além das complicações clássicas da doença, o DM tem sido associado com a redução da resposta de células T, as funções de neutrófilos, e distúrbios da imunidade humoral (PELEG et al, 2007).

Células mononucleares e monócitos de pessoas com DM secretam menos interleucina 1 (IL-1) e IL-6 em resposta à estimulação por lipopolissacáridos. Verifica-se que a baixa produção de interleucinas é uma consequência de um defeito intrínseco nas células de indivíduos com DM (JEFFCOATE et al, 2004).

A via clássica da reação de Maillard, também denominada glicação, inicia-se com a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente suscetível à reação. Na sequência, sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori, modernamente conhecido como *early Maillard reaction products (early MRPs)* ou produtos iniciais da reação de Maillard (BARBOSA et al, 2008).

Outros estudos relataram que a glicação aumentada poderia inibir a produção de IL-10 por células mieloides, assim como de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose

tumoral (TNF)- α por células T. A glicação irá também reduzir a expressão de classe I do complexo de histocompatibilidade principal da superfície de células mieloides, prejudicando a imunidade celular (JEFFCOATE et al, 2004).

Segundo HATANAKA et al (2006), neutrófilos e monócitos de pacientes diabéticos tem produção alterada de citocinas pró-inflamatória: IL-8, TNF- α e IL-1 β podendo essas afetar o processo inflamatório. As funções de neutrófilos também são alteradas em diabéticos (MARHOFFER et al, 1993). Resultando em uma série de alterações como, por exemplo, dificuldade no processo de cicatrização de feridas BRUNNER & BLAKUTNY (2004), o que os tornam mais susceptível ao desenvolvimento de úlceras, podendo resultar em amputação do membro.

2.3 Uso do laser em baixa intensidade

Os efeitos biomoduladores da LLLT têm sido relatados desde o princípio do seu uso em atividades biológicas levando à proliferação de fibroblastos, aceleração da formação do tecido de granulação, além de promover a síntese de colágeno, angiogênese e epitelização. (de ARAÚJO et al, 2007). Sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al, 1975).

Nos pacientes diabéticos a laserterapia acelera o fechamento das úlceras crônicas, independente dos níveis de glicemia do paciente. Os mecanismos pelos quais o laser promove este efeito ainda estão pouco estabelecidos (KAVIANI et al, 2011)

REDDY (2003) comparou dois tipos diferentes de laser com 7 mW e 1 J/cm², He-Ne e infravermelho Ga-As na cicatrização de feridas de diabéticos. Os animais foram tratados durante 5 dias três vezes por semana e com relação ao fechamentos das margens, força tensional da ferida e quantidade de colágeno foi observando que o laser He-Ne é superior ao Ga-As.

RABELO et al.(2006) realizaram uma análise da cicatrização de úlceras em animais diabéticos tratados com laser He-Ne de 15 mW e 10J/cm² verificando que estes animais

apresentavam um processo inflamatório com menos componentes teciduais (células inflamatórias, vasos e fibroblastos por área), do que o grupo controle.

Entretanto, em 2010 a *Wound Healing Society* lançou a atualização do *Guidelines for the best care of chronic wounds*, nos quais estão incluídas as recomendações para o manejo da úlcera em diabéticos, citando a laserterapia como potencial agente adjuvante, mas que necessita de maiores investigações e evidências científicas (DAVID et al, 2006).

Alguns estudos experimentais em animais e observações clínicas mostraram evidências de que a luz laser acelera o processo de reparação tecidual, induzindo a atividade mitótica celular, modificando a densidade capilar e aumentando a síntese de colágeno além de acelerar no processo de cicatrização, pela transformação de fibroblastos em miofibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER et al, 1990; SOUDRY et al, 1988).

A energia absorvida pode atuar na modulação na liberação de substâncias pré-formadas, como histamina, serotonina e bradicinina e também modificando reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação ou inibição (CRESSONI, 2009).

O mecanismo de interação do laser em nível molecular foi descrito primeiramente por KARU (1989). Os incrementos de ATP mitocondrial que se produzem após a irradiação com laser, favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular com a estimulação seletiva das mitocôndrias, provocando um aumento na produção de ATP intracelular dando origem à aceleração das mitoses. Consequentemente são facilitados o aumento do consumo de oxigênio, a ativação da respiração celular, suprimindo-se os processos anaeróbicos que se desenvolvem no tecido com inflamação, criando condições para se evitar o desenvolvimento da acidose e da alteração secundária distrófica da microcirculação no tecido, que é condicionado ao aumento da concentração de íons H^+ e de outros componentes tissulares (KARU, 1989).

Alguns dos motivos do não estabelecimento da laserterapia na literatura são a falta de padronização da dosimetria, método de entrega da energia e a falta de entendimento dos mecanismos celulares e moleculares de ação, sendo que existe uma dose mínima para conseguir efeito e altas doses levam a um efeito inibitório (AL-WATBAN et al, 2007; AL-WATBAN et al, 2009; RABELO et al, 2006).

Tendo como base a necessidade do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de lesões relacionadas à DM, o objetivo deste trabalho é avaliar o mecanismo de ação da laserterapia em regimes diferentes de entrega de energia traçando um perfil morfológico do reparo tecidual e do infiltrado inflamatório.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se há diferença no reparo cutâneo de ratos diabéticos submetidos a dois regimes de entrega do laser em baixa intensidade comparado ao controle não irradiado.

3.2 Objetivos específicos

- I- Averiguar a eficiência da terapia através da avaliação da morfologia do reparo tecidual em animais diabéticos comparando os dois grupos laser com o grupo controle;
- II- Quantificar a presença de neutrófilos, linfócitos, linfócitos T ativados e macrófagos durante o reparo tecidual e avaliar se há diferença entre os dois regimes de entrega da luz laser;

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo foi elaborada atendendo aos princípios de ética e experimentação animal, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base nas normas internacionais, que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal baseando-se em três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência. Protocolo de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (AN 03/2013).

4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 54 ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando entre 140 e 250 g, mantidas no biotério da UNINOVE – unidade Vergueiro. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, num máximo de 3 animais por caixa, a temperatura ambiente (22°C) e luminosidade controlados com ciclo de 12 horas sendo que os animais tiveram comida e água *ad libitum*.

Todos os animais sofreram indução e os que se converteram em diabéticos foram divididos aleatoriamente em grupos com 3 animais cada:

Grupo controle (GC) - a úlcera dorsal não foi submetida a tratamento;

Grupo dose única (GU) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia duas horas após a realização da ferida (D1);

Grupo dose fracionada (GF) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia duas horas após a realização da ferida, e nos dias 1, 3, 8, 10, 15 e 22.

4.2. Indução do diabetes

A indução do diabetes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Reddy, 2003. Os animais ficaram 12 horas em jejum alimentar de acordo com o protocolo e as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e receberam injeção intraperitoneal da toxina para células beta pancreáticas, streptozocina (cat S0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na dose de 50mg/kg peso dissolvida em tampão citrato estéril, pH 6,0. A indução ocorreu em média de sete dias sendo confirmada por exame de glicemia por meio do Accu-Chek (Boehringer Mannheim Cor. Indianapolis, IN, USA). A monitoração do nível de glicemia foi realizada semanalmente pelo mesmo método. O consumo de água e ração foi monitorado diariamente.

4.3. Procedimentos Cirúrgicos - indução da úlcera

A úlcera foi realizada em todos os grupos após 07 dias de indução do diabetes. Para a anestesia os animais receberam injeção intraperitoneal de uma mistura de ketamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP) na dose de 80mg/kg do animal e de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP) na dose de 10mg/kg do animal. Foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

Após anestesiados, o dorso dos animais foi tricotomizado com máquina elétrica e a finalização deu-se com uso de um creme depilatório a base de tioglicolato (Veet, Reckitt Benckiser, São Paulo, Brasil). Em seguida, realizada uma úlcera com *punch* cirúrgico de 8 mm (Richter, São Paulo, Brasil).

Posteriormente os animais foram mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia.

4.4. Laserterapia

Um laser vermelho, $\lambda = (660 \pm 2) \text{ nm}$, com potência de saída igual a 30 mW e área do feixe de $0,04 \text{ cm}^2$ (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), como foi acoplado a um sistema óptico de modo a obter-se um feixe expandido de 10 mm de diâmetro que cobrisse as bordas da feridas, a área irradiada foi de $0,785 \text{ cm}^2$, assim a ferida foi irradiada de maneira uniforme.

O grupo dose única recebeu, de uma única vez, duas hora após a ferida, a densidade de energia de 4 J/cm^2 , com a mesma potência 30 mW, área de $0,785 \text{ cm}^2$, e tempo de exposição quatro vezes maior, isto é, 104 s.

O grupo dose fracionada recebeu, por quatro vezes, nos dias 1, 3, 8 e 10, a densidade de energia de 1 J/cm^2 , com potência de 30 mW e tempo de exposição de 26 s, área de $0,785 \text{ cm}^2$, conforme parâmetros já estudados na literatura.⁴⁰⁻⁴¹

4.5. Análise do fechamento da ferida

Nos dias 1, 3, 8, 10, 15 e 22 os animais foram anestesiados, imobilizados sempre na mesma posição e com o mesmo nível de tração dos membros. As feridas cutâneas foram fotografadas com câmara profissional Nikon F301 semi-automática acoplada em um tripé a 30 cm do animal. As imagens foram digitalizadas e posteriormente visualizadas em tela de computador, e as margens da ferida foram traçadas manualmente com um *mouse* usando o *software* ImageJ 1.45 (acesso livre, NIH, Bethesda, Maryland, USA), dessa forma a área foi calculada em função da quantidade de pixels. Cada ferida foi avaliada em triplicata em dias diferentes e foi considerada a média dos resultados.

O desenho do estudo segue abaixo:

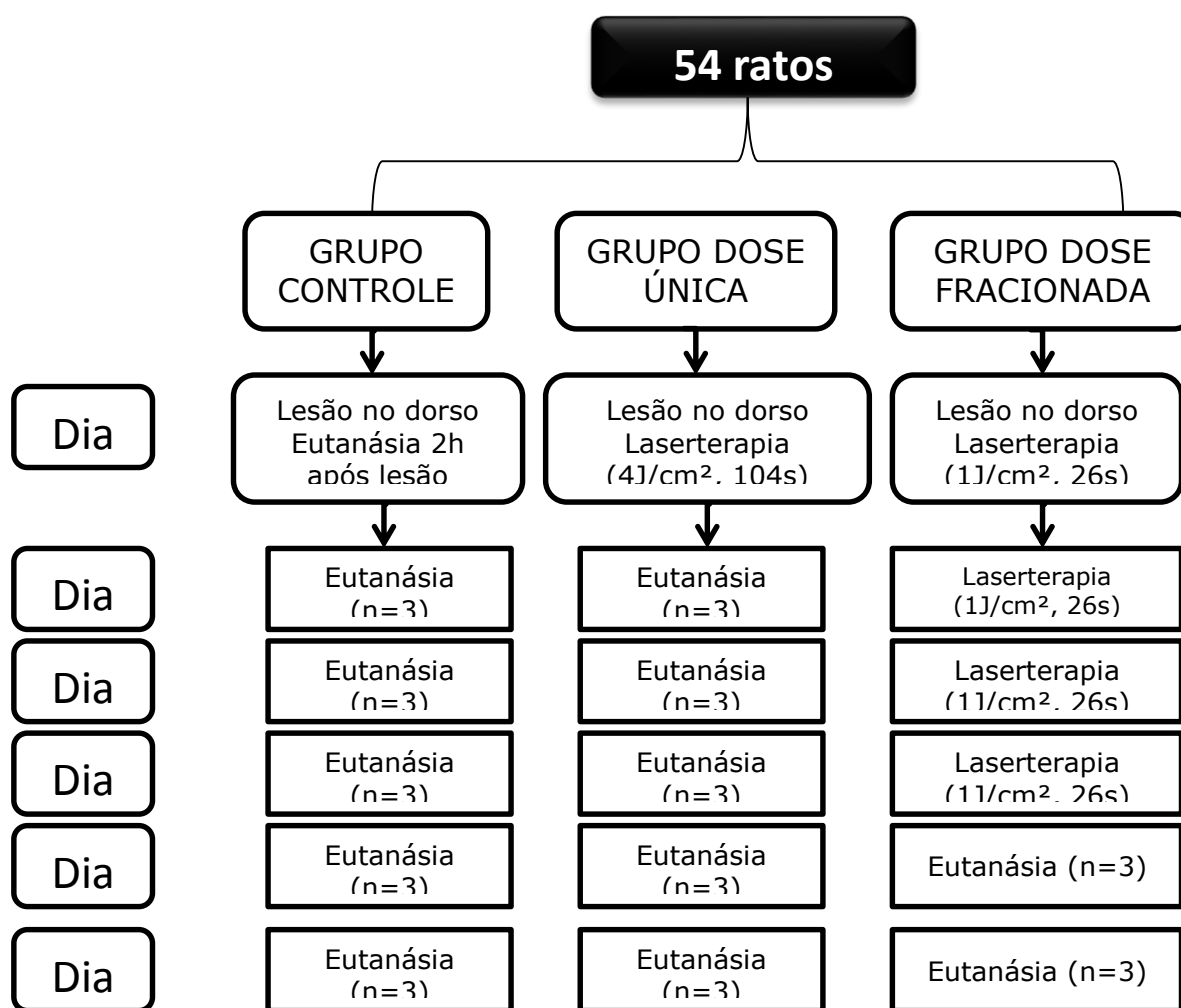


Figura 1 – Desenho do estudo

4.6. Análise histológica

Nos dias experimentais (1, 3, 8, 10, 15 e 22), três animais de cada grupo sofreram eutanásia em câmara de CO₂. As peles foram cuidadosamente removidas, fixadas com formaldeído a 10% tamponado e processadas rotineiramente para inclusão em parafina e posterior coloração com hematoxilina e eosina.

O reparo foi avaliado por dois avaliadores calibrados, sem conhecimento prévio dos grupos. Os seguintes parâmetros foram avaliados de modo qualitativo: intensidade do infiltrado inflamatório, presença de tecido de granulação e remodelamento do colágeno. Para tal foi utilizado microscópio (NIKON ECLIPSE 50i, Japão) e os dados foram submetidos a análise estatística apropriada.

4.7. Imunohistoquímica para marcadores celulares e citocinas

Cortes de tecido com 5 µm foram dispensados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) e posteriormente agrupados em suporte adequado. Em seguida foi realizada a desparanifinização, por meio da imersão das lâminas em xilol (60 – 65° C), e colocados em estufa histológica durante 5 minutos e posteriormente passadas em 3 banhos de xilol frio.

Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° ou 80° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou tampão tris-base salino pH 7,4 (TBS).

O próximo passo é a recuperação dos sítios antigênicos realizada em alta temperatura com solução tampão de ácido cítrico 10 mM pH 6 (panela a vapor) por 15 minutos. Após esta etapa ocorre o esfriamento do tampão por mais 15 minutos.

Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias com 3 banhos 5 min. de água oxigenada 10v (3%), após esta etapa as lâminas foram

lavadas muito bem em água corrente, água destilada e deixadas em tampão salino (PBS/TBS).

A próxima etapa foi a incubação do anticorpo primário por 16 horas a 4°C. Todos os anticorpos primários foram diluídos em diluente específico (Spring Bioscience Corp – Pleasanton - EUA) que contém em sua fórmula albumina sérica bovina (BSA) e tampão fosfato, pH 7,4. No dia seguinte os cortes foram lavados por 2 vezes durante 5 minutos em TBS e posteriormente incubados com o anticorpo secundário não diluído (Histofine – Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japão) por 30 minutos em estufa 37 °C.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados e especificações

Anticorpo	Fabricante/ catálogo	Recuperação antigênica	Concentração
Anti-CD3	Abcam (ab5690)	tampão citrato pH6,0 a 100°C, 15 minutos	1:300
Anti-CD45RO	Abcam (ab86080)	tampão citrato pH 6,0 a 100°C, 15 minutos.	1:75
Anti-CD68	Abcam (ab31630)	tampão citrato pH6,0 a 100°C, 15 minutos	1:600
Anti-CD31	Abcam (ab24590)	tampão citrato pH 6,0 a 100°C, 15 minutos	1:500
Anti-Elastase	Abcam (ab68672)	pepsina, a temperatura ambiente, 15 minutos	1:3500

Após esta incubação os cortes foram lavados em TBS e incubados com o cromógeno DAB- Diaminobenzidina (Dako - Dinamarca) por 5 a 10 min. Posteriormente ocorreu a lavagem em água corrente por 10 min. e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 1min.

4.8. Contagem celular

Após a marcação de imunohistoquímica, 5 campos consecutivos da área da ferida foram fotografados em um aumento de 400 x (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e as imagens digitalizadas das células marcadas foram contadas com auxílio do *software* ImageJ 1.45 (*software* livre, NIH, Bethesda, Maryland, USA) usando-se o *pluggin* “cell counter”.

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As contagens celulares foram submetidas a testes estatísticos apropriados para avaliação da diferença entre os dois regimes de entrega da radiação, dose única e dose fracionada.

Os dados não se adequaram a uma distribuição normal ou log-normal, os mesmos foram analisados com o teste não-paramétrico de Wilcoxon, com nível de significância $p < 0,05$. Para apresentação dos dados serão utilizados gráficos do tipo caixa e quartis construídos de acordo com a mediana dos resultados.

Toda a análise dos dados foi realizada com o *software* Origin Pro 8[®] (OriginLab, Northampton, USA).

5. – RESULTADOS

5.1. Artigo 1 – enviado para publicação – The Scientific World Journal

Comparison of single and multiple applications of diode laser for the healing of skin wounds in diabetic rats

Cristiano de Loura Santana¹, Daniela de Fátima Teixeira da Silva², Mariana Teixeira Gomes³, Alessandro Melo Deana⁴, Kristianne Porta Santos Fernandes⁴, Sandra Kalil Bussadori⁴, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari⁴, Cristiane Miranda França⁴



The screenshot displays the Hindawi Publishing Corporation website interface. At the top, the Hindawi logo and name are visible, along with the text 'Hindawi Publishing Corporation'. A navigation bar includes links for 'Submit a Manuscript' and 'Author Activities'. The main content area shows the details for a research article with ID 580354. The article title is 'Comparison of single and multiple applications of diode laser for the healing of skin wounds in diabetic rats', published in 'The Scientific World Journal' under the 'Dentistry' subject area. The article is in the 'Regular' issue. The authors listed are Cristiano de Loura Santana, Daniela Fátima Teixeira Silva, Mariana Teixeira Gomes, Alessandro Melo Deana, Kristianne Porta Santos Fernandes, Sandra Kalil, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, and Cristiane M. França. The manuscript was submitted on 2013-09-01 and is currently 'Under Review'.

580354 (Research Article)	
Title	Comparison of single and multiple applications of diode laser for the healing of skin wounds in diabetic rats
Journal	The Scientific World Journal
Subject Area	Dentistry
Issue	Regular
Additional Files	Cover Letter
Manuscript Number	580354 (Research Article)
Submitted On	2013-09-01
Authors	Cristiano de Loura Santana, Daniela Fátima Teixeira Silva, Mariana Teixeira Gomes, Alessandro Melo Deana, Kristianne Porta Santos Fernandes, Sandra Kalil, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, Cristiane M. França
Status	Under Review

SUMMARY

The healing process is often inefficient in diabetic patients, leading to chronic ulcers. Laser therapy is a promising tool employed to assist in the closure of such wounds, but the lack of standardization regarding dosimetry and the incomplete understanding of the cellular and molecular mechanisms of action involved limit the use of this resource. The aim of the present study was to perform a morphological evaluation of the wound repair process in diabetic animals submitted to laser therapy, comparing two systems of laser delivery. Fifty-four male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with diabetes induced by an intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg) were used. A wound was produced on the back of each animal with an 8-mm punch. Experimental groups: 1) control group (CG) – not submitted to treatment; 2) single-dose group (SDG) – laser therapy applied to ulcer two hours after induction of wound; and 3) fractionated-dose group (FDG) – laser therapy applied to ulcer in fractionated doses on Days 1, 3, 8 and 10. The following were the laser parameters: $\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 4$ J/cm², $t = 104$ s in the SGD and four doses of $\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 1$ J/cm², $t = 26$ s (totaling 4 J/cm²) in the FDG. Animals were euthanized on Days 1, 3, 8, 10, 15 and 22. The ulcers were removed, routinely processed for hematoxylin and eosin staining and analyzed for the presence and type of inflammatory infiltrate as well as the presence of granulation tissue. The morphological analysis demonstrated that laser with the parameters employed alters chemotaxis in neutrophils and accelerates re-epithelialization, collagen remodeling and the healing process. The results were more pronounced in the SDG, but the wounds were similar in all groups by Day 22. This study could serve as the basis for further investigations employing more refined methods to determine wound status following the administration of this therapeutic tool and confirm the use of laser as a complementary resource for the treatment of ulcers in individuals with diabetes.

Key words: diabetes, lasers, wound healing, morphology

INTRODUCTION

An estimated 170 million people worldwide have diabetes mellitus (DM). The risk of death among such individuals is nearly twofold greater in comparison to individuals of the same age without diabetes due to the chronic complications of the disease [1, 2]. One such complication is impaired tissue repair, which is characterized by the inhibition of the inflammatory response, angiogenesis and fibroplasia as well as defects in collagen deposition and differentiation of the extracellular matrix [3].

Laser therapy is a valuable noninvasive treatment for wound healing. The positive photobiomodulation effects depend on parameters such as wavelength, power density, energy, exposure time and application frequency. The choice of the appropriate parameters is essential to a favorable outcome [4].

Although studies have demonstrated that laser therapy accelerates the wound repair process, few investigations have addressed the effect of different dosimetric protocols on diabetic ulcers [4-7]. It remains unknown whether a wound irradiated a single time would repair as effectively as a wound submitted to multiple irradiations at different moments of the healing process. This is a crucial issue, as single-dose laser therapy could increase patient adherence due to the reductions in time and treatment costs.

The aim of the present study was to perform a morphological evaluation of the wound repair process in diabetic animals submitted to laser therapy, comparing two systems of laser delivery.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fifty-four female adult Wistar rats weighing 140-250 g were used. The animals were kept in individual plastic cages under a 12-h light/dark cycle with water and granulated food *ad libitum*. All procedures were carried out in compliance with the Brazilian Ethical Principles for Animal Experimentation and the study received approval from the Ethics Committee on Research Involving Animals of the University Nove de Julho (Brazil) under process number ANS – 026/12.

Chemical induction of diabetes

The animals were fasted for 12 h with free access to water. Diabetes was induced with single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) freshly dissolved in 0.05 M citrate buffer at a dose of 60 mg/kg of body mass. Blood glucose levels were monitored weekly throughout the experiment. Animals with fasting blood glucose greater than 220 mg/dL and stable body mass after one week were selected for the experiment.

Injury model

The diabetic animals were anesthetized with 80 mg/kg of ketamine HCl (Dopalen, Vetbrands, Sao Paulo, Brazil) and 10 mg/kg of xylazine (Anasedan, Vetbrands, SP, Brazil). Back fur was removed using an electric shaver, followed by a thyoglicolate depilatory cream (Veet Cream, SP, Brazil), and the skin was cleaned with a 0.12% chlorhexidine solution. Two round wounds were produced in the central portion of the dorsum using an 8-mm surgical punch (Richter, SP, Brazil). To prevent hypothermia, the animals were kept on a warm plate (37°C) until complete recovery from anesthesia.

Experimental groups

The animals were divided into three groups: 1) control group (CG; n = 18) – not submitted to treatment; 2) single-dose group (SDG; n = 18) – laser therapy applied to ulcer two hours after induction of wound; and 3) fractionated-dose group (FDG; n = 18) – laser therapy applied to ulcer in fractionated doses on Days 1, 3, 8 and 10.

Laser irradiation

A gallium-aluminum-arsenide diode laser (MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) was employed. The following were the parameters for the SDG: beam spot = 0.785 cm²; 30 mW output power; wavelength (λ) = 660 $\pm$ 2; 4 J/cm² energy density (D); and 104 s exposure time (t). For the FDG group, the parameters were four doses of λ = 660 $\pm$ 2 nm, D = 1 J/cm², t = 26 s, totaling 4 J/cm². A LaserCheck power meter (Coherent, Santa Clara, CA, USA) was used to determine the output of the equipment.

Laser irradiation was initiated 2 h following injury in the SDG and FDG. The FDG received laser irradiation on Days 1, 3, 8, and 10. The laser tip was covered with protective transparent film and was placed in contact with the skin surface over the injury. An amplification lens was used to

enhance the spot to 10 mm in diameter to ensure that the entire ulcer would receive light. Control lesions received no light and were left to heal spontaneously, following the normal course of a diabetic wound.

Evaluation of wound healing

On Days 1, 3, 8, 10, 15 and 22, the animals were anesthetized and the dorsum was photographed with a professional camera (Nikon F301 semi-automatic) on a tripod placed at a distance of 30 cm from the animal. The digital images were analyzed using the ImageJ 1.45 program (free software, NIH, Bethesda, Maryland, USA). The wound margins were traced manually and the program calculated the perimeter. Each wound was evaluated in triplicate and the mean was considered for the statistical analysis.

Morphological analysis

Three animals per group were euthanized on Days 1, 3, 8, 10, 15 and 22 with overdose of anesthesia. Skin samples were carefully collected, fixed in 10% buffered formalin and routinely processed with hematoxylin and eosin staining for subsequent histological analysis. Three areas of the injured site (left border, middle and right border) were photographed (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A blinded examiners with no prior knowledge of the samples analyzed the images for presence/absence of ulcer, acute inflammatory infiltrate, chronic inflammatory infiltrate, granulation tissue and collagen remodeling. At least three slides from each animal were examined and the data were submitted to statistical analysis.

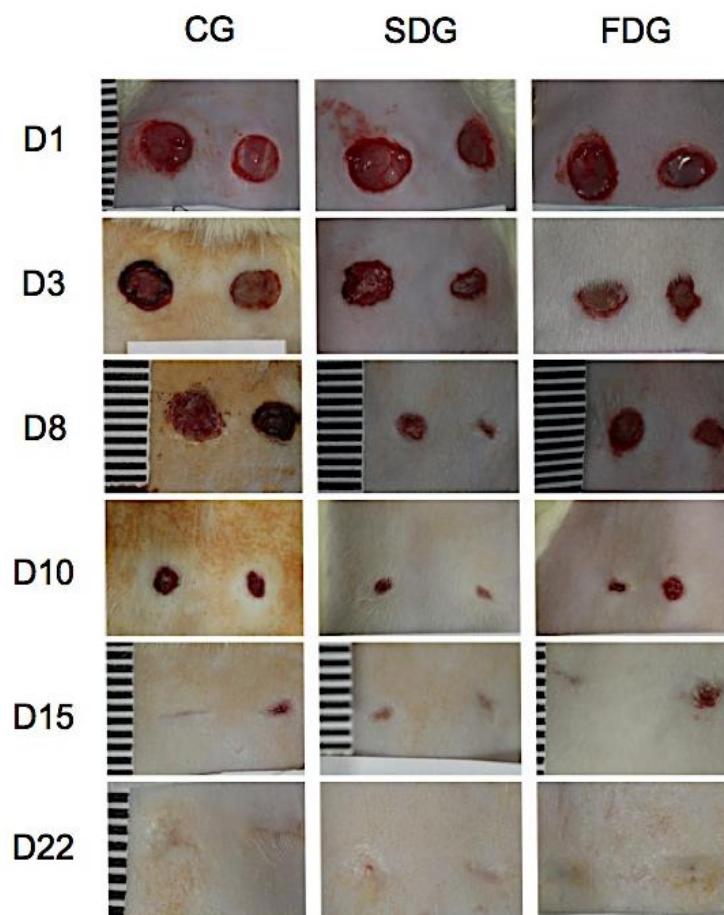
Statistical analysis

The results were analyzed using the Minitab 16 software program (Minitab Inc, USA). The Student's t test was used for the analysis of the perimeter of the lesion. As the data on acute and chronic infiltrate were nonparametric, the Friedman test was used. Poisson's test was employed to determine differences in the rates of granulation tissue and remodeling (dichotomous variables). The significance level for all tests was set to 95% ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

Evaluation of wound healing

On Day 1, all animals had 8-mm wounds. Figure 1 shows the course of ulcer healing at the different evaluation times.



Throughout the experiment, the crust of the wound in the groups submitted to laser therapy was consistently dry and firmly adhered to the adjacent skin. On Day 15, the SDG exhibited complete wound closure, whereas ulcers were still found in the CG and FSG. All wounds in all groups were healed by Day 22. No statistically significant differences between groups were found regarding the perimeter of the ulcers ($p = 0.24$).

Morphological analysis

On Days 1 and 3, all groups exhibited ulcers, acute inflammatory infiltrate and fibrin clots (Figure 2A, B and C). On Day 3, the SDG and FDG exhibited more neutrophils in comparison to the CG ($p= 0.001$). Moreover, the largest quantity of neutrophils was found in the SDG ($p= 0.009$). On Day 8, the wounds in the FDG exhibited some neutrophils and fibrin clots (Figure 2F and Graph 1).

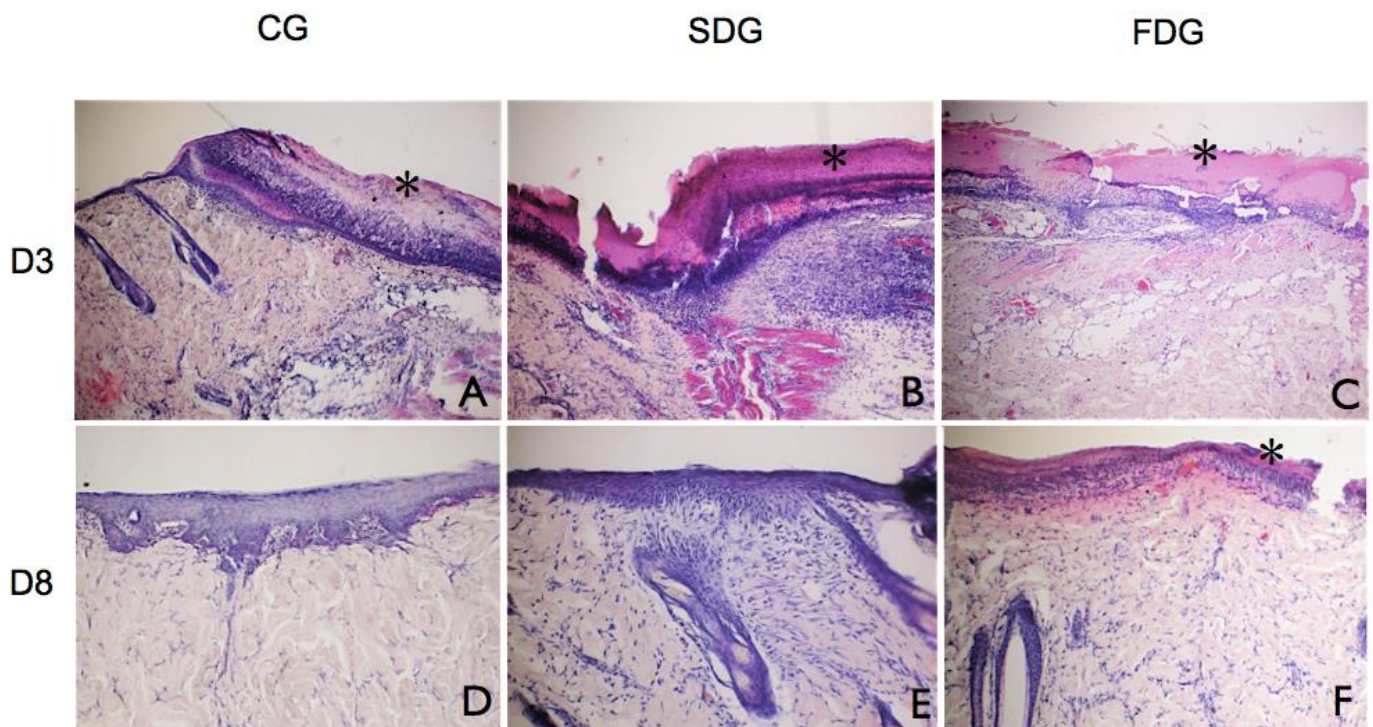
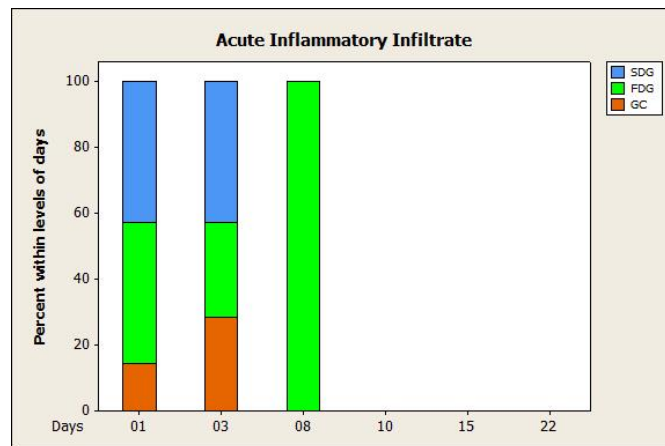


Figure 2 – Photomicrographs of ulcers on Days 3 and 8, showing fibrin clot (*) and acute inflammatory infiltrate. Note the exuberant granulation tissue in the SDG on Day 8 (hematoxylin & eosin; magnification: 100 x).



Graph 1: Acute inflammatory infiltrate in tissue sections studied

On Day 8, all groups exhibited chronic inflammatory infiltrate and granulation tissue. The SDG exhibited significantly greater quantities of mononuclear cells ($p = 0.01$) and granulation tissue ($p = 0.003$).

On Days 10 and 15, re-epithelization and granulation tissue were found in all groups. Notably, the SDG exhibited less cellularity in the granulation tissue on Day 15 in comparison to the other groups (Figure 3 A, B and C). On Day 22, all wounds in all groups exhibited complete re-epithelization, hyperplasia of hair follicles and areas of fibrosis (Figure 3 D, E and F).

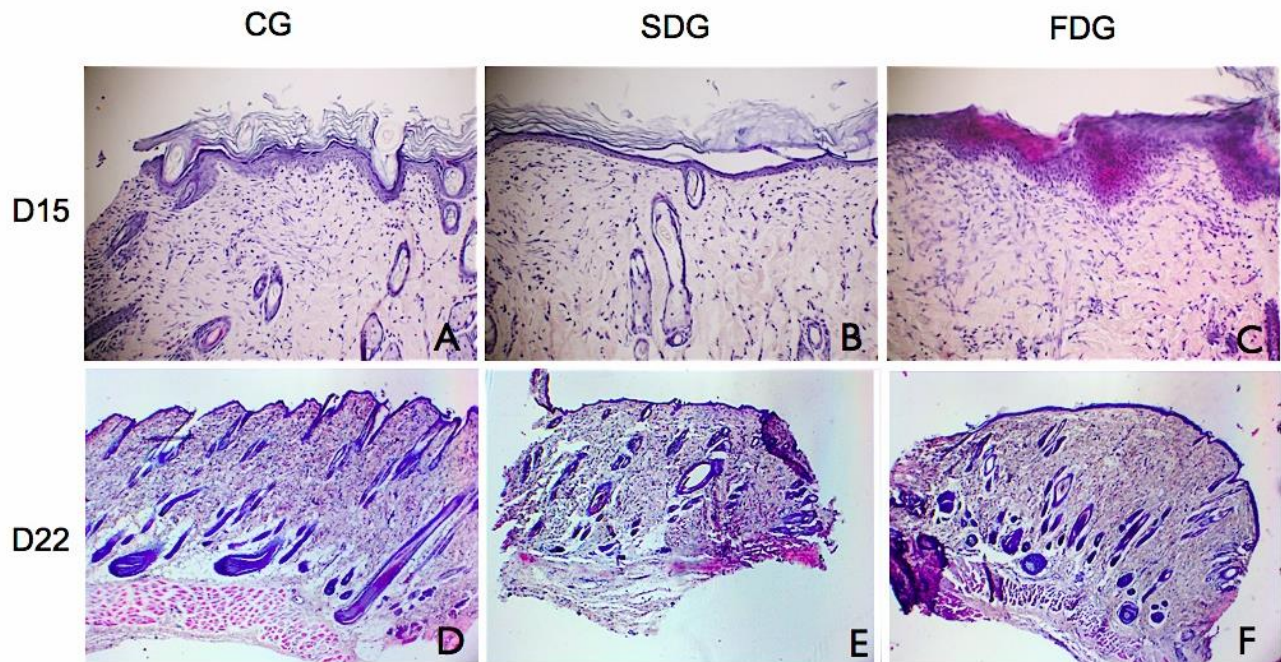
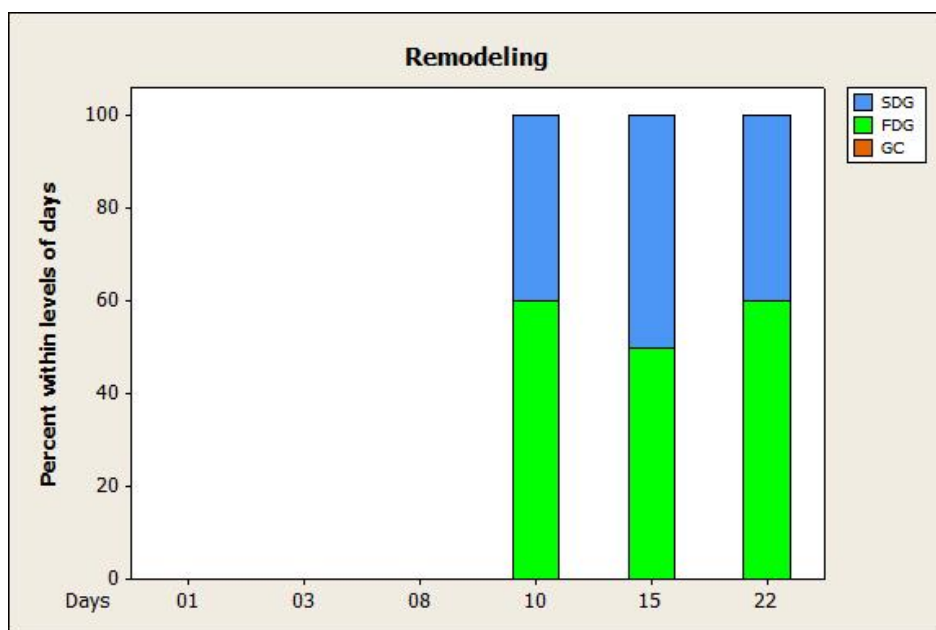


Figure 3 – Photomicrographs of wound site showing granulation tissue on Day 15. Note the lesser cellularity in the SDG in comparison to the other groups. On Day 22, all wounds were healed (hematoxylin & eosin; magnification: 100 x [A, B and C]; magnification: 40 x [D, E and F]).

Regarding the remodeling of the connective tissue, significant differences were found between the CG and FDG ($p = 0.003$) and between the CG and SDG ($p = 0.014$) on Day 10; between the CG and both irradiated groups ($p = 0.003$) on Day 15; as well as between the CG and FDG ($p = 0.003$) and between the CG and SDG ($p = 0.014$) on Day 22. No statistically significant differences were found between the two groups submitted to laser irradiation (Graph 2).



Graph 2: Fibroblast alignment (remodeling) in tissue sections studied

DISCUSSION

The present findings demonstrate that the application of laser within the parameters employed alters the morphology of diabetic ulcers in rats. However, the differences apparently disappear at the end of 22 days.

Closure of the ulcers occurred first in the SDG, with all wounds re-epithelialized by Day 15. The ulcers in the other groups were healed by Day 22. While the findings suggest no long-term difference between the application and non-application of laser therapy to diabetic ulcers, one should bear in mind that the extreme conditions of hyperglycemia hinder the healing process and open wounds are susceptible to infection. Therefore, the earliest possible closure of ulcers is better for the patient.

The literature generally establishes multiple doses of laser therapy. However, patient adherence is compromised in long application protocols, especially at services where the demand is great or in low-income populations. In a previous study involving burn wounds, our research group investigated two laser delivery protocols and no statistically significant difference was found between the single-dose and fractionated-dose applications [8]. However, questions remained as to why this occurred and a difference in the morphology of the burns was found between groups throughout the healing process. However, it was not within the scope of the study to pursue these findings.

As diabetes is an important public health problem and foot ulcers are the main cause of amputations in such patients [9], the decision was made to investigate the effects of different laser delivery protocols on the tissue repair process based on studies in the literature reporting laser therapy to be a promising tool employed to accelerate this process [10-14]. The morphological analysis revealed that laser therapy is effective in the treatment of ulcers in diabetic mice in comparison to untreated mice, which is in agreement with findings described in the literature [10-14].

An interesting finding that merits further study is that the SDG experienced earlier inflammation and tissue repair. The photomicrographs and results of the statistical analysis for this group revealed greater neutrophilic infiltrate, more exuberant granulation tissue on Day 8 and lesser cellularity in the wound on Day 15, which is indicative of the final healing stage (remodeling). By Day 22, no significant differences were found among the groups. More refined analysis methods, such as the study of birefringence, collagen parallelism and tissue strength at the wound site, are needed to determine whether the healed tissue in the group that received a

single dose of laser is of better quality in comparison to the other groups. It should be stressed, however, that both laser protocols achieved better results throughout the healing process in comparison to the CG, which is an important finding that can be applied in clinical practice for the treatment of ulcers in patients with diabetes. Moreover, the single-dose protocol translates to lesser travel time on the part of the patient as well as lower treatment costs in comparison to the conventional laser protocol, which is generally more than two sessions per week [15]. These are important aspects in the realm of public health care.

According to Karu, it is not an easy task to specify the events triggered by laser irradiation even in cell cultures [16]. For instance, fibroblast cell cultures submitted to laser irradiation may undergo an accelerated division phase or may initiate the production of collagen fibers. The mechanisms behind these manifestations remain unclear. The present findings reveal that a single-dose of laser irradiation triggered a sequence of biological events that culminated in a more characteristic morphology of the advanced healing process. However, further studies are needed to determine the specificity of this event.

A number of authors suggest that the laser irradiation dose is cumulative, whereas others suggest that the effects are cumulative, rather than the dose. Analyzing the present results, if the dose is cumulative, both irradiated groups would be statistically equal after Day 10, when the FDG received its final irradiation, which, in fact, occurred. However, one cannot discard the possibility that the effects are also cumulative, considering the morphological difference in the SDG on Day 15 in comparison to the other groups. While the effects of irradiation at 4 J/cm² in a single session and four times at 1 J/cm² in multiple sessions were the same in terms of acute and chronic inflammatory infiltrate, granulation tissue and remodeling, the pathologist noted better healing in the group submitted to the single-dose protocol. Future studies should investigate whether the same results would be found in the SDG and FDG if irradiation were initiated one or two days following the injury rather than initiated on the same day. This would allow mimicking a more real clinical situation, as injured patients do not generally seek immediate health care.

In conclusion, the morphological analysis in the present study demonstrates that laser delivery with the parameters employed alters chemotaxis in neutrophils and accelerates re-epithelialization, collagen remodeling and the healing process. However, all wounds in all groups were healed by Day 22. This study could serve as the basis for further investigations employing more refined methods to determine wound status following the administration of this therapeutic tool and confirm the use of laser as a complementary resource for the treatment of ulcers in individuals with diabetes.

Aknowledgements

This investigation was supported by Research Grant # 2012/01944-0 from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP).

The authors thank Dr. Marcelo Tavares de Oliveira for the technical assistance with the photographs.

REFERENCES

- 1.L. S. David, A. Christopher, C. Theodore, C. Mary, F. Michael, L. Harkless, A. Johnson, H. Moosa, M. Robson, T. Serena, P. Sheehan, A. Veves, L. Wiersma-Bryant. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers”, *Wound Repair and Regeneration*, vol. 14, no. 6, pp. 680-692, 2006.
- 2.R. Jacobsen, E. Vadstrup, M. Røder, A. Frølich. “Predictors of effects of lifestyle intervention on diabetes mellitus type 2 patients”, *ScientificWorldJournal*, vol. 2012, pp. 962951.
3. G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker. “Wound repair and regeneration” *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 314-321, 2008.
- 4.M. Güngörmüş M, U. K. Akyol. Effect of biostimulation on wound healing in diabetic rats”, *Photomed Laser Surg*, vol. 27, no. 4, pp. 607-610, 2009.
- 5.C. M. França, C. M. França, S. C. Núñez, R. A. Prates, E. Noborikawa, M. R. Faria, M. S. Ribeiro. “Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 94, no.1, pp. 25-31, 2009.
- 6.A. Kaviani, G. E. Djavid, L. Ataie-Fashtami, M. Fateh, M. Ghodsi, M. Salami, N. Zand, N. Kashef, B. Larijani. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report”, *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 2, pp. 109-114, 2011.
- 7.G. K. Reddy. Comparison of the photostimulatory effects of visible HeNe and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wounds”, *Lasers Surg Med*, vol. 33, pp. 344-351, 2003.
- 8.S. C. Núñez, C. M. França, D. F. Silva, G. E. Nogueira, R. A. Prates, M. S. Ribeiro. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats”, *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 633-641, 2013.
- 9.C. Druet, I. Bourdel-Marchasson, A. Weill, E. Eschwege, A. Penfornis, S. Fosse, C. Fournier, M. Chantry, C. Attali, P. Lecomte, D. Simon, N. Poutignat, A. Gautier, M. Risse, A. Fagot-Campagna. Type 2 diabetes in France: epidemiology, trends of medical care, social and economic burden”, *Presse Med*, vol. 42, no. 5, pp. 830-838, 2013.
10. A. M. Fulop, S. Dhimmer, J. R. Deluca, D. D. Johanson, R. V. Lenz, K. B. Patel, P. C. Douris, C. S. Enwemeka. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair”, *Photomed Laser Surg*, vol. 27, no. 5, pp. 695-702, 2009.

11. N. N. Houreld, P. R. Sekhejane, H. Abrahamse. "Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells", *Lasers Surg Med*, vol. 42, no. 6, pp. 494-502, 2010.
12. P. R. Sekhejane, N. N. Houreld, H. Abrahamse. "Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro", *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 8, pp. 521-530, 2011.
13. M. Nouruzian, M. Alidoust, M. Bayat, M. Akbar. "Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats", *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 399-405, 2013.
14. J. J. Park, K. L. Kang. "Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study", *Lasers Med Sci*, vol. 27, no. 1, pp. 223-230, 2012.
15. R. Obradovic, L. Kesic, G. Jovanovic, D. Petrovic, G. Radicevic, D. Mihailovic. "Low power laser efficacy in the therapy of inflamed gingive in diabetics with parodontopathy", *Vojnosanitetski Pregled*, vol. 68, no. 8, pp. 684-689, 2011.
16. T. Karu. "High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy", *Lasers Surg Med*, vol. 34, no. 4, pp. 298-299, 2004.

5.2. Artigo 2 – Em preparação para ser enviado ao Journal of Investigative Dermatology

Inside laser biomodulation mechanisms in a diabetes experimental model.

Cristiane Miranda França¹, Cristiano de Loura Santana², Josiane Ferrareto Shibuya², Brunna Pileggi de Azevedo Sampaio², Amanda Pires de Souza², Raquel Agnelli Mesquita Ferrari¹, Sandra Kalil Bussadori¹, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Daniela de Fátima Teixeira da Silva³

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the effect of different laser delivery methods on the repair of ulcers under conditions of hyperglycemia. Ulcers measuring 8 mm in diameter were made on the dorsum of 54 Wistar rats with diabetes induced by streptozotocin. The animals were divided into three groups: G1 (control) – untreated ulcers; G2 – ulcers submitted to a single dose of laser therapy ($\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 4$ J/cm², $t = 104$ s) two hours after injury; and G3 – ulcers submitted to fractionated doses of laser therapy ($\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 1$ J/cm², $t = 26$ s) on Days 1, 3, 8 and 10. Three animals from each group were euthanized on Days 1, 3, 8, 10, 15 and 22. The ulcers were removed, processed for hematoxylin/eosin and picrosirius red staining for the analyses of morphology and collagen types I and III. Immunohistochemical analysis was also performed for the detection of T lymphocytes, macrophages and myofibroblasts. The results demonstrate that biomodulation is dependent on the light delivery regimen. Changes were found in chemotaxis for T lymphocytes and macrophages as well as in the proportions of collagen types I and III. The group submitted to fractionated laser therapy exhibited better healing in comparison to the other groups.

Key words: laser therapy, wound repair, diabetes, macrophage, streptozotocin, collagen

INTRODUCTION

Laser therapy has been employed with increasing frequency in the clinical setting as a complement for pain control and the acceleration of the tissue repair process of chronic ulcers, burns and surgical wounds. The biomodulating effects of laser therapy include increased mitosis and angiogenesis, changes in the synthesis of cytokines, increased collagen synthesis and assistance in the conversion of fibroblasts into myofibroblasts.³¹⁻³² These effects have been demonstrated in both pre-clinical studies and clinical trials. However, the lack of standardization regarding dosimetry and light delivery regimens and the incomplete understanding of the associated cellular and molecular mechanisms of action limit the use of this resource.

Wound healing is characterized by a coordinated, progressive set of events divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling. The aim of this process is to restore the barrier function and mechanical integrity of the skin through the recruitment of mediators, blood cells, extracellular matrix and stem cells.¹¹⁻¹² In diabetic patients, however, tissue repair mechanisms are compromised due to reductions in the T cell response and neutrophil function as well as changes in humoral immunity, collagen synthesis and angiogenesis.⁶ Thus, individuals with diabetes are more susceptible to the development of chronic ulcers.³⁻⁴

Considering laser therapy to be a potential complement to the healing of chronic ulcers caused by diabetes, the aim of the present study was to contribute knowledge on biomodulation triggered by laser therapy and investigate the effect of different light delivery regimens on the chemotaxis of T lymphocytes, macrophages and myofibroblasts as well as the amount and proportion of collagen types I and III.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fifty-four female adult Wistar rats (weight: 140 to 250 g) were kept in individual plastic cages (12-h light/dark cycle) with free access to water and ration. This study received approval from the Animal Research Ethics Committee of the University Nove de Julho (Brazil; process number: ANS 026/12) and was carried out in compliance with Brazilian Ethical Principles for Animal Experimentation.

Chemical induction of diabetes

After fasting for 12 h with free access to water, diabetes was induced in all animals with an intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.05 M citrate buffer (dose: 50 mg/kg of body mass). Blood glucose levels were measured on a weekly basis. Animals with fasting blood glucose > 220 mg/dL and stable body mass after one week were selected for the experiment.

Injury model

Anesthesia was performed with 80 mg/kg of ketamine HCl (Dopalen, Vetbrands, Sao Paulo, Brazil) and 10 mg/kg of xylazine (Anasedan, Vetbrands, SP, Brazil). Fur was removed from the back of each animal with an electric shaver and a hair removal cream (Veet Cream, SP, Brazil). The skin was then cleaned with a 0.12% chlorhexidine solution. An 8-mm surgical punch (Richter, SP, Brazil) was used to produce round wounds in the central portion of the dorsum. The animals were maintained on a warm plate (37° C) to prevent hypothermia until complete recovery from the anesthesia.

Experimental groups

The animals were divided into three groups: G1 (control group; n = 18) – untreated ulcers; G2 (n = 18) – ulcers submitted to a single dose of laser therapy ($\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 4$ J/cm², $t = 104$ s) two hours after injury; and G3 (n = 18) – ulcers submitted to fractionated doses of laser therapy ($\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 1$ J/cm², $t = 26$ s] on Days 1, 3, 8 and 10. These days were chosen as representative of crucial moments in the repair process: the inflammation phase (Days 1 and 3), proliferation phase (Days 8 and 10) and remodeling phase (Days 15 and 22).

Laser irradiation

A gallium-aluminum-arsenide diode laser (MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) was employed. The parameters used in G2 were beam spot: 0.04 cm², output power: 30 mW, wavelength (λ): 660 ± 2 , energy density (D): 4 J/cm², exposure time (t): 104 s; and the parameters in G3 were four doses of $\lambda = 660 \pm 2$ nm, $D = 1$ J/cm² and $t = 26$ s, totaling 4 J/cm². The output of the equipment was determined using a power meter (LaserCheck, Coherent, Santa Clara, CA, USA). The laser head was covered with plastic wrap and placed in direct contact with the ulcer.

The spot was enlarged to 10 mm in diameter using an amplification lens to ensure complete coverage of the ulcer.

Light microscopy

Three animals from each group were euthanized on Days 1 (2 hours after injury and laser irradiation), 3, 8, 10, 15 and 22 with an overdose of anesthesia. The ulcers were removed, fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4) and embedded in paraffin. One 5- μ m section from each sample was stained with hematoxylin and eosin for microscopic analysis.

Immunohistochemical analysis of macrophages, T lymphocytes and myofibroblasts

Serial sections of paraffin-embedded tissues (3 μ m) were placed on glass slides coated with 2% 3-aminopropyltriethylsilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and de-paraffinized in xylene, followed by immersion in alcohol and incubation with 3% hydrogen peroxide diluted in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4). The sections were blocked by incubation with normal goat serum 3% for 20 minutes and immersed in citrate buffer (pH 6.0; Sigma) at 95° C for 20 minutes for antigen retrieval. The slides were then incubated with one of the following antibodies: anti-CD68 (ABCAM, ab31630, Cambridge, UK), anti-CD3 (ABCAM, ab5690) and anti-alpha smooth muscle actin (SMA) (ABCAM, ab5694). The samples were kept overnight at 4° C in a humidified chamber, followed by washing of the sections with TBS, incubation with N-Histofine Simple Stain (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) for 30 minutes and incubation in 3,3'-diaminobenzidine in a chromogen solution (Dako) at room temperature for two to five minutes. The sections were then stained with Mayer's hematoxylin and covered. For the negative controls, the primary antibodies were replaced with 1% PBS/bovine serum albumin and nonimmune mouse serum (X501-1, Dako).

Cell count

Five consecutive microscope fields (magnification: 400 x) of the wound area were photographed (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). An experienced pathologist with no prior knowledge of the samples analyzed the images with the aid of the ImageJ 1.45 program (free software, NIH, Bethesda, Maryland, USA), using the "cell counter" plug-in.

Proportion of collagen types I and III

The analysis of collagen I and III deposition and remodeling was performed on histological cuts of samples stained with picrosirius red and examined under a polarizing microscope (Pol-Interferencial Photomicroscope - Model 61282, Carl Zeiss, Germany). Using this system, collagen III fibers emit green light and collagen I fibers emit orange to red light. The photographs were digitalized and treated using the ImageJ 1.45 software program to quantify each type of collagen and determine the proportions of types I and III.

Birefringence analysis

For the evaluation of collagen birefringence and parallelism, histological cuts (8 μ m in thickness) were placed on slides and de-paraffinized [5]. Readings were made with the samples soaked in distilled water for the determination of birefringence using a polarizing microscope (Pol-Interferencial Photomicroscope - Model 61282, Carl Zeiss, Germany) with a high-pressure mercury bulb (HBO 200W) for illumination and an interference filter (PIL 546) for the determination of monochromatic light at $\lambda = 546$ nm. The readings were conducted with a de Sénarmont compensator, which introduces an optical retardation of $\lambda/4$. When the difference in the optical path of the sample is equal to the retardation of the compensator, destructive interference occurs between the ordinary and extraordinary rays emanating from the sample, characterized by a dark background seen in the ocular of the microscope. The field varies in position (in degrees) in relation to the light beam. Upon encountering this dark field, the angle in the microscope is read by the accessory that complements the equipment. This angle, denominated α , is related to the optical birefringence of the sample based on the following equation:

$$\Delta n = \frac{\alpha}{180^\circ} \lambda$$

When $\lambda = 546$ nm, the equation becomes:

$$\Delta n = \frac{\alpha}{180^\circ} 546 \Rightarrow \Delta n = \alpha \cdot 3.03 \text{ nm}$$

Thus, to determine the optical birefringence (Δn) of the samples in nm, the angle (α) read in the microscope is multiplied by 3.03 nm. Ten α readings were performed for each histological cut.

Statistical analysis

The Minitab 16 program (Minitab Inc, USA) was used for the statistical analysis. The cell count data proved to be nonparametric. Thus, the Kruskal Wallis test was used for the

comparisons, with the level of significance set to 95% ($\alpha = 0.05$), the Dunn test was applied as a post hoc.

RESULTS

The morphological analysis of the ulcers demonstrated that all groups underwent the inflammation, proliferation and remodeling phases on the expected days. Inflammation and the formation of granulation tissue were exacerbated in the group submitted to a single session of laser therapy through to Day 10. However, all significant morphological differences among groups had disappeared by Day 22.

Immunohistochemical analysis of T lymphocytes, macrophages and myofibroblasts

T lymphocytes

On Day 1, the amount of CD3+ cells in all groups were statistically similar ($p=0.13$) (Figure 1). On Days 3 and 8 G1 presented more CD3+ cells than G2 ($p=0.01$ and $p=0.03$ respectively). On Days 10 and 15 all groups were alike ($p= 0.13$ and $p=0.41$ respectively). On Day 22, G3 presented more T cells than the other groups ($p=0.0004$).

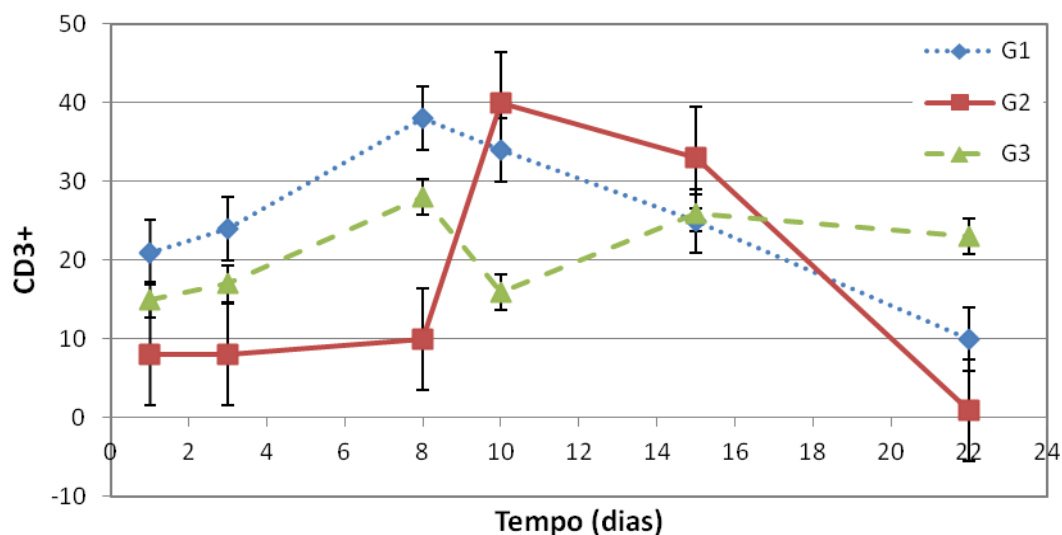


Figure 1: Quantification of T lymphocytes (labeled with anti-CD3 antibody) in ulcers throughout experiment.

Macrophages

The evaluation of macrophages labeled by the anti-CD68 antibody demonstrated that on Day 1 there was no statistical difference among the groups ($p=0.14$) (Figure 2). Throughout the inflammation phase and part of the proliferation phase (through to Day 10), G2 had a significantly greater number of macrophages (D3 $p=0.01$; D8 $p=0.0005$; D10 $p=0.04$, followed by G3 and G1. In the remodeling stage, on Day 15, G1 presented more CD68+ cells than G2 ($p=0.01$), but no significant differences existed between G2 and G3. On Day 22, the differences disappeared ($p=0.16$).

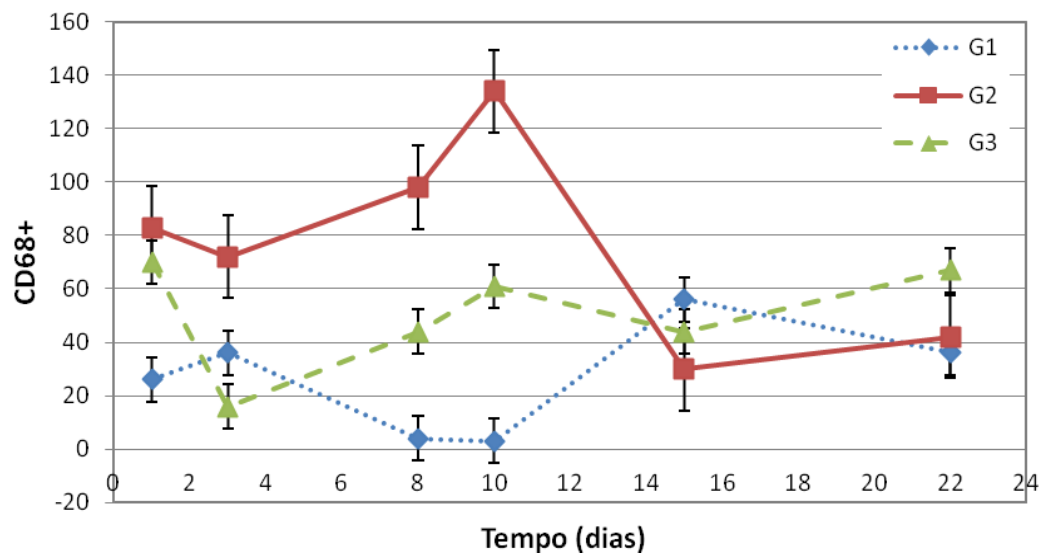


Figure 2: Quantification of macrophages (labeled with anti-CD68 antibody) in ulcers throughout experiment.

Myofibroblasts

As expected, few constitutive myofibroblasts were found in the skin at the beginning of the experiment, whereas an increase in the number of labeled cells was found in all groups by Day 8 (proliferation phase). In the remodeling phase, G3 had the greatest number of myofibroblasts on Day 15, followed by G1 and G2, and no significant differences among groups were found on Day 22 (Figure 3).

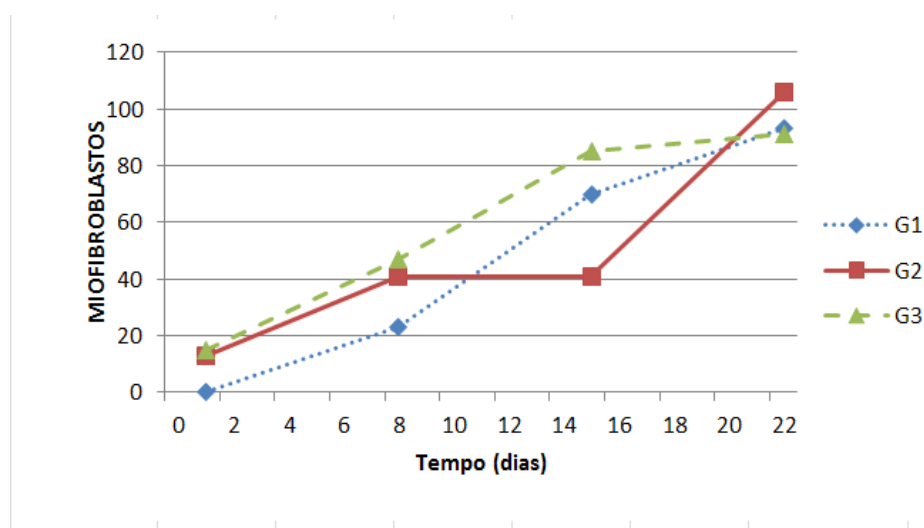


Figure 3: Quantification of myofibroblasts in ulcers throughout experiment. A constant increase is seen in all groups through to the end of the experiment, with a significant difference only on Day 15, when G2 exhibits the lowest number of myofibroblasts.

Proportion of collagen types I and III

Figure 4 and Table 1 display the proportion of collagen types I and III.

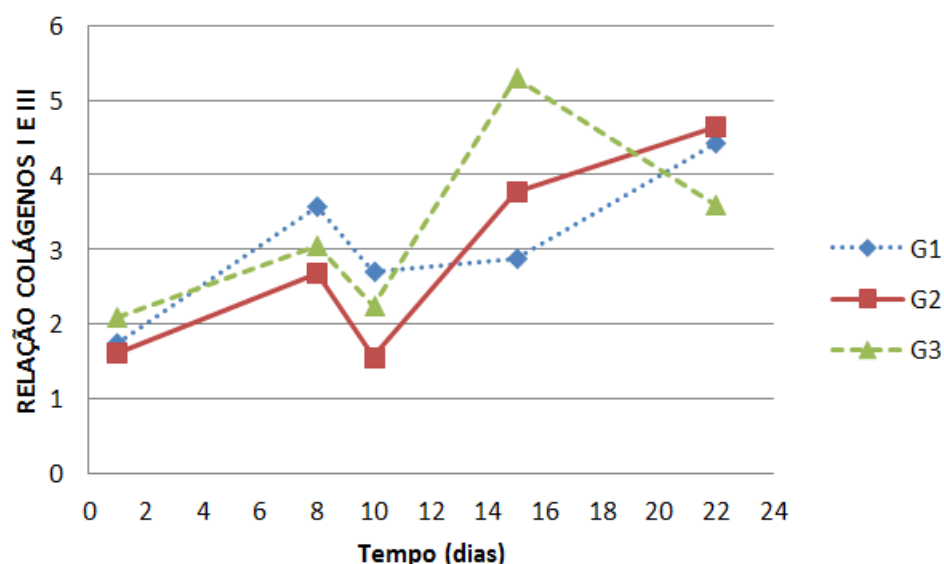


Figure 4: Proportion of collagen I and III throughout healing process. In the inflammation phase, little collagen of either type is seen and the ratio is small. The ratio increases progressively in all groups through to Day 8. On Day 10 (proliferation phase), the production of collagen III is increased, with a consequent decrease in the ratio. On Day 15 (remodeling phase), the increase in collagen I leads to an increase in the ratio, with the most accentuated change found in G3. On Day 22, the ratio increases in both G1 and G2

due to the increase in collagen I, whereas the ratio diminishes in G3 due to the reduction in collagen I.

Day/Group	G1	G2	G3
1	1.73	1.60	2.08
8	3.56	2.68	3.05
10	2.69	1.55	2.25
15	2.88	3.76	5.29 *
22	4.42	4.64	3.60 *

Table 1: Numeric values of collagen I to III ratio throughout experiment

As expected, the collagen I to III ratio in the ulcers was low on Day 1, since collagen had been replaced by the clot and was present only on the margins of the ulcer. This ratio increased throughout the inflammation phase of the repair process. On Day 10 (proliferation phase), the ratio diminished in all groups as a result of the increase in collagen III. On Day 15 (onset of remodeling phase), an increase in the ratio occurred in all groups due to the increase in the amount of collagen I, which was most accentuated in G3. On Day 22, an increase in the ratio was found in G1 and G2 due to the increase in the amount of collagen I, whereas a decrease in the ratio was found in G3 due to the decrease in the total amount of collagen I.

Collagen birefringence

The analysis of collagen birefringence demonstrated that G3 exhibited more parallel collagen at the end of the experiment (Figure 5).

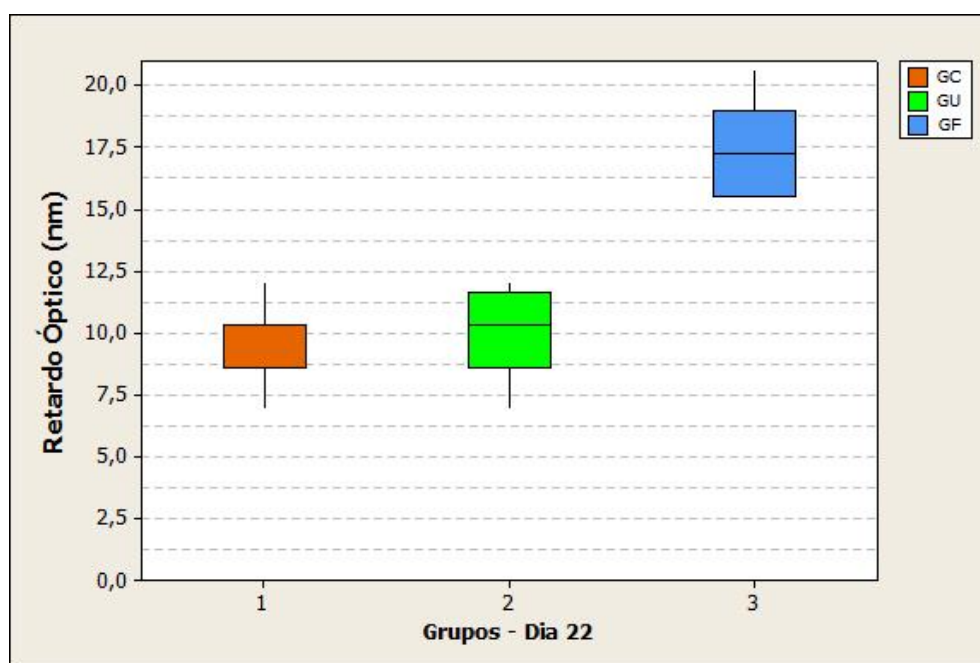


Figure 5: Optical retardation; Groups – Day 22

Fractionated dose group showed more optical retardation, interpreted as more collagen parallelism (Mann-Whitney test, $p=0.0001$)

DISCUSSION

The findings of the present study demonstrate that biomodulation induced by laser therapy is dependent on the light delivery regimen, with alterations in the chemotaxis of T lymphocytes and macrophages as well as in the proportions and parallelism of collagen types I and III. The administration of fractionated doses at key moments in the tissue repair process [two days in the inflammation phase (Days 1 and 3), one day in the proliferation phase (Day 8) and one day in the transition phase between proliferation and remodeling (Day 10)] led to a repair process of better quality. This enhanced healing was demonstrated by: (1) the reduction in the collagen I to III ratio to values similar to those found in normal skin, which ensures the flexibility of the skin, and (2) more collagen parallelism.

Diabetes is a public health problem, the prevalence of which was estimated at 177 million individuals worldwide in the year 2000, with this figure expected to reach 350 million by 2025. A large number of amputations unrelated to trauma occur in patients with diabetes and 85% of these amputations are preceded by skin ulcers. The experimental diabetes model employed in the present study simulates type 1 diabetes, as streptozotocin is toxic to pancreatic beta cells, thereby producing a tissue response under conditions of hyperglycemia.

Mild hyperglycemia leads to a pro-inflammatory state that is well-described in the literature and demonstrated by the T cell counts in the present study. On days 3 and 8 following injury, the control group exhibited the largest amount of lymphocytes. However, on days 10 and 15, at the proliferative phase of repair, the content of CD3+ cells remained similar in all groups. And on Day 22, the group submitted to fractionated doses of laser therapy maintained a relatively higher number of T lymphocytes.

Striking differences were found among the three groups regarding macrophage chemotaxis. Activated macrophages are the main effector cells of the tissue repair process, as these cells degrade and remove components of the damaged connective tissue, secrete chemotactic factors and produce prostaglandins, which are vasodilators, thereby affecting the permeability of microvessels.¹⁴⁻¹⁶ In the present study, it was demonstrated that CD68+ cells are really responsive to laser therapy doses. As expected, the CD68+ cells amount was alike in the first day, because the peak of chemotaxis of macrophages is after 18-24 hours. On the inflammatory phase the group submitted to a single dose had a large amount of positive CD68 cells through to Day 10, after which the numbers dropped to similar amounts to those found in the control group. In contrast, from Day 8 on, the group submitted to fractionated doses of laser therapy exhibited a constant intermediate level of CD68+ cells between the other two groups. This indicates that the macrophage response was laser dose dependent. Further studies are being performed to clarify this issue, as macrophages may undergo polarization in M1 or M2, leading to

the production of free radicals, tumor necrosis factor and pro-inflammatory cytokines that can increase tissue lesions (M1) or fibrosis due to the production of tumor growth factor-beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor and arginase (M2).

Fibroplasia is a mechanism that involves the proliferation of fibroblasts and their migration to the interior of injured tissue by the stimulus of growth factors, such as TGF- β , which also induces the differentiation of myofibroblasts (fundamental to the repair process), as these cells synthesize extracellular matrix and contribute greatly to the contraction of the wound.^{17,18} As macrophages play a fundamental role in the organization of the repair and the production of TGF- β , the decision was made in the present study to quantify myofibroblasts in the ulcers. All groups exhibited a similar behavior through to Day 8, whereas the different doses of laser therapy demonstrated opposite effects on Day 15, with the group submitted to a single dose exhibiting the least amount of myofibroblasts and the group submitted to fractionated doses exhibiting the largest amount. No significant differences among groups were found on Day 22.

The effect on the amount of collagen types I and III was also investigated. As expected, all groups exhibited a similar behavior in the inflammatory phase due to the virtual nonexistence of collagen synthesis. On Day 10, peak angiogenesis occurs, with a consequent increase in the synthesis of collagen III, which remains around the blood vessels, leading to a reduction in the collagen I to III ratio. The differences appeared on Day 15 (remodeling phase), when the group submitted to fractionated doses of laser therapy exhibited the largest amount of collagen I, followed by the group submitted to a single dose. An important change occurred on Day 22, when no significant differences were found between the control group and group submitted to the single dose, whereas a reduction in the amount of collagen I occurred in the group submitted to the fractionated doses, indicating an effective remodeling process in this group. These findings were corroborated by the data on collagen parallelism analysis on Day 22 that demonstrated an increased optical retardation in the fractionated dose group, related to higher parallelism rates in this group. An increase of collagen parallelism is associated with increased healthy tissue amount, decreased repaired tissue quantity, and better fibril organization, which is consistent with a secondary intention repair and in conformity with previous studies [Silva et al., 2006].

The present findings can serve as the basis for future studies aimed at gaining a better understanding of the biomodulation mechanics of laser therapy in complex experimental models. Such investigations can lead to the safe, effective application of laser therapy on humans, especially individuals with systemic conditions that exert a direct impact on the inflammatory phase of the tissue repair process, such as diabetes.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest related to this study.

Acknowledgments

This study was supported by Research Grant # 2012/01944-0 from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil. The authors thank Mariana Gomes Teixeira and Emy Luciene for their technical assistance in the laboratory.

REFERENCES

- 1.L. S. David, A. Christopher, C. Theodore, C. Mary, F. Michael, L. Harkless, A. Johnson, H. Moosa, M. Robson, T. Serena, P. Sheehan, A. Veves, L. Wiersma-Bryant. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers”, *Wound Repair and Regeneration*, vol. 14, no. 6, pp. 680-692, 2006.
- 2.R. Jacobsen, E. Vadstrup, M. Røder, A. Frølich. “Predictors of effects of lifestyle intervention on diabetes mellitus type 2 patients”, *ScientificWorldJournal*, vol. 2012, pp. 962951.
3. G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker. “Wound repair and regeneration” *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 314-321, 2008.
- 4.M. Güngörmüş M, U. K. Akyol. Effect of biostimulation on wound healing in diabetic rats”, *Photomed Laser Surg*, vol. 27, no. 4, pp. 607-610, 2009.
- 5.C. M. França, C. M. França, S. C. Núñez, R. A. Prates, E. Noborikawa, M. R. Faria, M. S. Ribeiro. “Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 94, no.1, pp. 25-31, 2009.
- 6.A. Kaviani, G. E. Djavid, L. Ataie-Fashtami, M. Fateh, M. Ghodsi, M. Salami, N. Zand, N. Kashef, B. Larijani. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report”, *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 2, pp. 109-114, 2011.
- 7.G. K. Reddy. Comparison of the photostimulatory effects of visible HeNe and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wounds”, *Lasers Surg Med*, vol. 33, pp. 344-351, 2003.
- 8.S. C. Núñez, C. M. França, D. F. Silva, G. E. Nogueira, R. A. Prates, M. S. Ribeiro. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats”, *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 633-641, 2013.
- 9.C. Druet, I. Bourdel-Marchasson, A. Weill, E. Eschwege, A. Penfornis, S. Fosse, C. Fournier, M. Chantry, C. Attali, P. Lecomte, D. Simon, N. Poutignat, A. Gautier, M. Risse, A. Fagot-Campagna. Type 2 diabetes in France: epidemiology, trends of medical care, social and economic burden”, *Presse Med*, vol. 42, no. 5, pp. 830-838, 2013.
10. A. M. Fulop, S. Dhimmer, J. R. Deluca, D. D. Johanson, R. V. Lenz, K. B. Patel, P. C. Douris, C. S. Enwemeka. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair”, *Photomed Laser Surg*, vol. 27, no. 5, pp. 695-702, 2009.

11. N. N. Houreld, P. R. Sekhejane, H. Abrahamse. "Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells", *Lasers Surg Med*, vol. 42, no. 6, pp. 494-502, 2010.
12. P. R. Sekhejane, N. N. Houreld, H. Abrahamse. "Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro", *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 8, pp. 521-530, 2011.
13. M. Nouruzian, M. Alidoust, M. Bayat, M. Akbar. "Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats", *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 399-405, 2013.
14. J. J. Park, K. L. Kang. "Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study", *Lasers Med Sci*, vol. 27, no. 1, pp. 223-230, 2012.
15. R. Obradovic, L. Kesic, G. Jovanovic, D. Petrovic, G. Radicevic, D. Mihailovic. "Low power laser efficacy in the therapy of inflamed gingive in diabetics with parodontopathy", *Vojnosanitetski Pregled*, vol. 68, no. 8, pp. 684-689, 2011.
16. T. Karu. "High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy", *Lasers Surg Med*, vol. 34, no. 4, pp. 298-299, 2004.
17. da Silva Dde F, Vidal Bde C, Zezell DM, Zorn TM, Núñez SC, Ribeiro MS. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. *J Biomed Opt*. 2006 Mar-Apr;11(2):024002.

5.3. Resultados não publicados

5.3.1. Anticorpo anti-CD31

A contagem para CD31 (que marca células da linhagem angiogênica) revelou que duas horas após a lesão, o grupo dose única apresentou o maior número de células marcadas, seguido pelo controle. O grupo dose fracionada apresentou baixa quantidade de células de linhagem angiogênica (CD31+). A partir do terceiro dia, o grupo controle mostrou queda na contagem de células CD31 positivas, com novo pico de células angiogênicas no dia 10, que é precisamente o período de maior angiogênese, e com nova queda no dia 15 e elevação no dia 22. O grupo dose única mostrou grande queda a partir do 3º dia, discreta elevação no dia 15 e nova queda no dia 22. Para o grupo dose fracionada houve modulação durante todo o tratamento mantendo os níveis de células angiogênicas baixos.

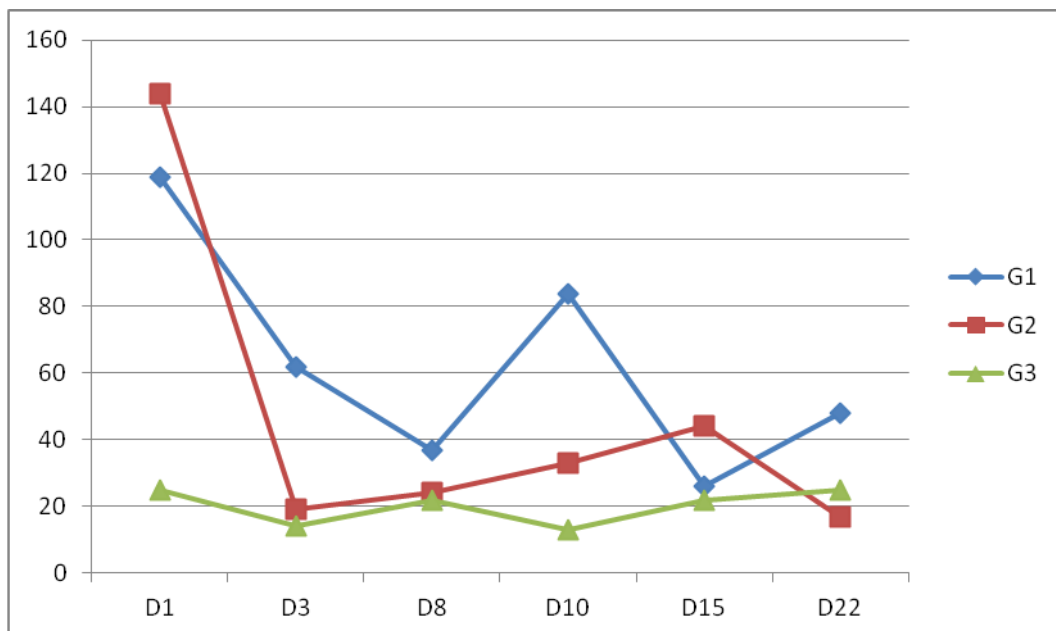


Figura 04: Marcação para células de linhagem angiogênica (CD31+) mostrando as variações entre os grupos. Nota-se que o grupo dose fracionada apresentou de modo constante a menor quantidade de células CD31+, seguido pelo grupo dose única e controle.

5.3.2. Anticorpo anti-elastase

A elastase é uma enzima produzida pelos neutrófilos, e por isso, considerada um marcador fidedigno do mesmo. No D1 o grupo dose única apresentou o maior influxo de neutrófilos, seguido pelo grupo controle e por fim, dose fracionada. No dia 3 O grupo controle apresentou mais neutrófilos, seguido pelo grupo dose única, e grupo dose fracionada. No dia 10 o grupo dose fracionada voltou a apresentar mais neutrófilos que o grupo dose fracionada e controle. A partir do dia 10 o grupo dose fracionada não apresentou mais neutrófilos, o grupo controle apresentou poucos neutrófilos até o dia 22, e o grupo dose única mostrou pico no dia 15 e se igualou aos demais no dia 22.

Nota: Os resultados do grupo 2 nos dias 3 e 15 são biologicamente difíceis de se explicar, por isso, novos experimentos estão sendo feitos para repetição das reações.

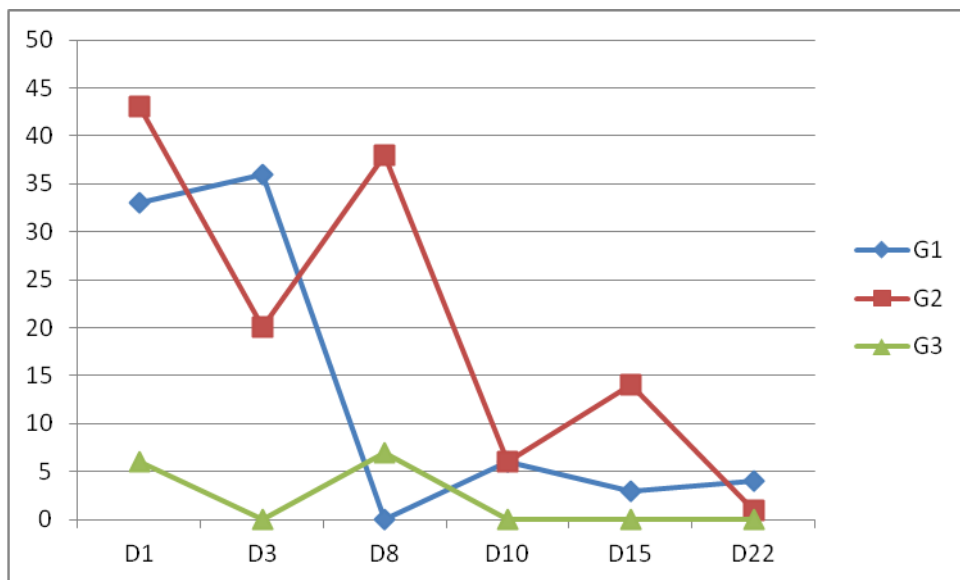
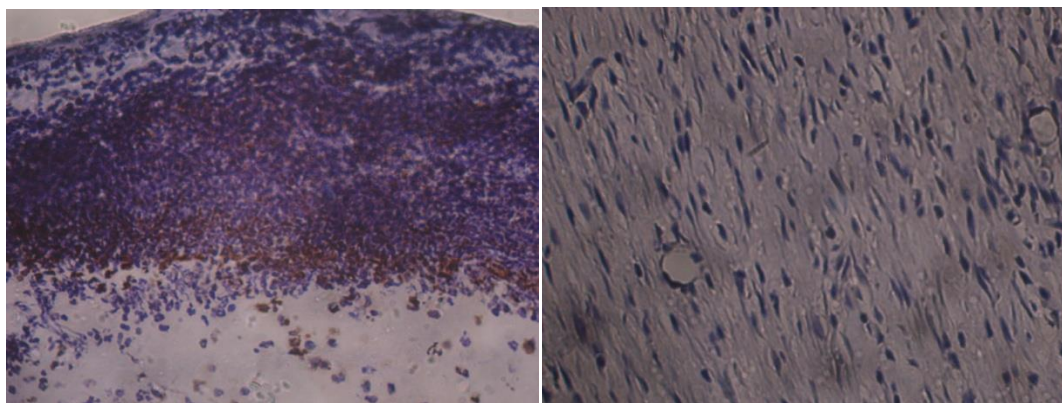


Figura 05: Marcação para neutrófilos (elastase+) mostrando as variações entre os grupos. Nota-se que o grupo dose fracionada apresentou de modo constante a menor quantidade de neutrófilos, seguido pelo grupo controle e dose fracionada.

5.3.3. Anticorpo anti-CD45ro

O anticorpo Cd45ro marca linfócitos T ativados e foi testado no controle positivo, o baço, e ora apresentava marcação inespecífica de fundo, e ora não havia marcação. Foi solicitada a troca do mesmo, pois houve problema na entrega, e o segundo frasco apresentou resultados semelhantes ao primeiro. Dessa forma, a análise do mesmo não foi incluída nesta tese.



Marcação para linfócitos T ativados, à esquerda controle com marcação bem definida em controle e à direita ausência de marcação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Quando comparadas ao grupo controle, as duas formas de entrega de energia são eficazes no tratamento de lesões cutâneas nos modelos experimentais utilizados;
- O grupo dose única apresentou maior aceleração na ativação do sistema imunológico e mais rapidez na cicatrização, porém com maior intensidade de deposição de colágeno ocasionando fibrose;
- O grupo dose fracionada apresentou desde o início tendência de resposta inflamatória modulada, sem picos e a cicatrização ocorreu de forma mais lenta, no entanto a deposição de colágeno foi menor proporcionando uma cicatriz com maior qualidade.

7. BIBLIOGRFIA

1. Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL, Al-Anize A. Visible lasers were better than invisible lasers in accelerating burn healing on diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):269-72.
2. Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):72-7.
3. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther.* 1991;52:407-22.
4. Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52/6:940-950
5. BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, v. 68, p. 1-8, 2000.
6. Brunner G, Blakutny R. Extracellular regulation of TGF-B activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Throm Haemost.* 2004;92:253-261
7. Carvalho BM, Neto RM, Aragão LP, Oliveira MM, Nogueira MB, Forti AC. Pé Diabético: Análise Bacteriológica de 141 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48/3:398-405
8. Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Efficiency of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet* 2009; 374: 1897–908
9. Clark RA. Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993 Aug;19(8):693-706.
10. Clark RA. *Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, (Second Edition). Plenum Press, New York, 1995.
11. Cressoni MDC. Influência do Laser AsGaAl sobre a cartilagem epifisária de ratos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2009.
12. David LS, Christopher A, Theodore C, Mary C, Michael Franz, Lawrence Harkless, Andrew Johnson, Hans Moosa, Martin Robson, Thomas Serena, Peter Sheehan, Aristidis Veves and Laurel Wiersma-Bryant. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 14(6):680-692, 2006.

13. de Araújo CE, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TM. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2007 Feb 1;86(2):87-96
14. Eming SA, Werner S, Bugnon P, Wickenhauser C, Siewe L, Utermo O, Davidson JM, Krieg T, Roers A. Accelerated Wound Closure in Mice Deficient for Interleukin-10. *The American Journal of Pathology*, Vol. 170, No. 1, January 2007
15. Frade, MAC, Úlcera de Perna: Caracterização Clínica e Perfil Imunohistopatológico da Cicatrização na Presença da Biomembrana de Látex Natural da Seringueira *Havea brasiliensis*. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo, 2003.
16. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21.
17. Hamblin MR, Huang Y-Y, Chen ACH, Carroll JD. Biphasic dose response in low level light therapy. *International Dose-Response Society* 2009; 7:358-383
18. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. *PM R*. 2010 December ; 2(12 Suppl 2): S292–S305. Doi:10.1016/j.pmrj.2010.10.013.
19. Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MSM, Campa A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Journal compilation © 2006 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 146: 443–447
20. Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. International Working Group on Wound Healing and Treatments for People with Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 578–89.
21. Karu T, Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 49 (1999) 1–17.
22. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing--part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds *International journal of dermatology*.2000;39:321-33.
23. Kaviani A, Djavid GED, Ataie-Fashtami L, Fateh M, Ghodsi M, Salami M, Zand N, Kashef N, Larijani B. *Photomedicine and Laser Surgery*. February 2011, 29(2): 109-114. doi:10.1089/pho.2009.2680.
24. Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Prac* 1993; 19:183–8.
25. Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An. Bras. Dermatol.* [online]. 2009, vol.84, n.3 [cited 2011-12-06], pp. 257-262

26. Mester E, Korenyi-Both A, Spiry T, Tisza S: The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers (preliminary report). *Z Exp Chir* 1975, the regeneration of muscle fibers (preliminary report). *Z Exp Chir* 1975, 8:258-262.
27. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, n. 16 Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2006
28. Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M. Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen.* 2005; 13:93–101.
29. Nuñez, SC, França CM, Silva DFT, Nogueira GEC, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers in Medical Science.* 2012 (carta de aceite 16/04/2012).
30. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/countries/bra/es/>
31. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TME Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 3–13. Published online 8 September 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/dmrr.682
32. Piccirillo LJ, Gonçalves MFR, Clemente ELS, Gomes MB. Marcadores de Inflamação em Pacientes Com Diabetes Mellitus Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48/2:253-260
33. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-Neon Laser Treatment Transforms Fibroblasts into Myofibroblasts. *American Journal of Pathology*, Vol. 137, No. 1, July 1990
34. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006 Aug;24(4):474-9
35. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible HeNe and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003;33:344-351.
36. Repáraz AL, Sánchez GC. El pie ói diabético. *An Med Interna (Madrid)* 2004; 21: 417-419.
37. Ribeiro MS, Da Silva Dde F, De Araújo CE, De Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM, Zezell DM. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *J Clin Laser Med Surg.* 2004 Feb;22(1):59-66.
38. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 2003 Feb;148(2):334-6

39. Soudry M, Franquin JC, Pourreau-Schneider N, Martin PM: Action d'un laser helium-neon sur la croissance cellulaire: Etude in vitro sur fibroblastes gingivaux humains. J Biol Buccale 1988,16:129-135
40. Stuani AS. Influência do Laser de Baixa Potência (GaAlAs) na Remodelação Óssea, após a disjunção da sutura palatina mediana em ratos Wistar. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2008
41. Toscano MC, Mengue SS. Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus no Brasil/Ministério da Saúde – Organização Pan-Americana da Saúde Brasília; Ed MS, 2004. P.13
42. Zhang CL, Popp FA. Log-normal Distribution of Physiological Parameters and the Coherence of Biological Systems. Medical Hypotheses 1994; 43:11-16.