



AMANDA LEMOS MARQUES

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO
TECIDUAL DE FERIDAS APÓS O USO DA
LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAs)
EM CAMUNDONGOS**

LAVRAS – MG

2012

AMANDA LEMOS MARQUES

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS
APÓS O USO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAs) EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Carlos Artur Lopes Leite

Coorientadores

Dra. Josilene Nascimento Seixas

Dr. Enio Ferreira

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Marques, Amanda Lemos.

Avaliação histológica do reparo tecidual de feridas após o uso da
laserterapia de baixa potência (GaAs) em camundongos / Amanda
Lemos Marques. – Lavras : UFLA, 2012.

94 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Carlos Artur Lopes Leite.

Bibliografia.

1. Pele. 2. Cicatrização. 3. Fototerapia. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0897477

AMANDA LEMOS MARQUES

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS
APÓS O USO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAs) EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de agosto de 2012.

| | |
|---------------------------------|------|
| Dra. Josilene Nascimento Seixas | UFLA |
| Dr. Enio Ferreira | UFMG |
| Dr. Geovanni Dantas Cassali | UFMG |

Dr. Carlos Artur Lopes Leite
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Dedico este trabalho a todos os amores da minha vida.

Minha amada e preciosa mãe, Elenita. Cada passo que dei você me ajudou a conquistar!

Meus irmãos, meus anjos, Alessandra e Carlos Júnior. Meu irmão do coração, Vinícius. Amo vocês!

Meus sobrinhos e sobrinhas, minhas vidas, Caio, Maria Fernanda, Manuela e João Vitor.

Toda minha família, tias, tios, primas e primos. Amo cada um de vocês...

Minha alma gêmea, cara metade, ao amor eterno da minha vida, Guilherme. Eu sei que vou te amar por toda minha vida!

Aos pais do meu marido, Sandra e Dorival e toda família dele que me adotou como membro da família. Amo cada um de vocês como se fossem meus parentes de sangue.

Às minhas amigas-irmãs Luna, Alessandra, Ana Paula Lopes, Cássia, Viviana, Laizi, Paula, Débora, Ana Paula Pires, Fernanda, Adriana e Suzana. Minha devoção e amizade eternas!

Aos meus animais de estimação, os que passaram por minha vida e os que ainda vivem nela (meus cães: Bike, Teka, Billy, Babby, Tica e filhotes, Belinha, Mel, Sabrina, Kiara e filhotes, Luna, Seika, Saori, Ike; meus cavalos: Faísca, Fagulha, Celina e Zara; minha tartaruga; meu gado de leite; meus peixes). Tenho certeza de que vocês entendem o meu imenso amor por vocês e por todos os animais. Amo ser veterinária e amo compartilhar o planeta com vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao Centro de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (REUNI/CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Profa. Dra. Mary.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Laboratório de Patologia Comparada (LPC) pela oportunidade concedida para realização do experimento deste estudo. À todos professores, alunos, estagiários, IC e às técnicas deste laboratório, especialmente Mirna, Marilene e Leymar.

Ao Prof. Dr. Carlos Artur Lopes Leite pela orientação, amizade e ensinamentos transmitidos na área da Dermatologia Veterinária.

À Profa. Dra. Josi Seixas e ao Prof. Dr. Enio Ferreira pela dedicação, paciência, amizade e ensinamentos que contribuíram para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional, especialmente pela descoberta e amor que adquiri pela Patologia Veterinária. Obrigada pelas ideias brilhantes e horas de discussão científica.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pela oportunidade, paciência, amizade e por se dispor a participar como membro na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Gregório Mattos Corrêa pela amizade e orientação na monitoria.

Ao Prof. Dr. Márcio Zangerônimo pela amizade e colaboração nos momentos mais difíceis durante a realização do mestrado.

Ao M. V. José Reinaldo Berin pela amizade e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Raimundo Vicente de Souza, Prof. Dr. Luciano José Pereira e ao técnico do biotério William pela amizade, paciência e profissionalismo.

Às amigas mestrandas Gisele, Ana Flávia e Raquel (Geninha) pela preciosa ajuda com moradia e, principalmente, pela amizade sincera e eterna.

Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo
dos animais. Nesse dia, um crime contra um animal
será considerado um crime contra a própria
humanidade
DaVinci (citado por RAVAZZANI, 1990, p. 48)

RESUMO

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

Palavras-chave: Pele. Cicatrização. Fototerapia.

ABSTRACT

This work aimed at determining the histological characteristics of skin healing and its relation to macrophagic infiltrate in mice submitted to low power GaAs laser therapy (λ 904 nm). Seventy four *Swiss* mice were submitted to a surgical skin wound in the thoracodorsal region and divided into two distinct groups: Laser Group, submitted to low power GaAs laser therapy (λ 904 nm) and Control Group, maintained without treatment during all the experimental period. Eight animals of each group were sacrificed at distinct times: day 1, 3, 7 and 14 after the injury was done and the treatment was established. The skin wounds were collected and submitted to histological processing for histomorphometric analysis, collagen fibers and elastic fibers. The macrophage per histological field was determined by means of the immunohistochemistry technique using the antibody CD68 (KP1; Zymed). A smaller inflammatory response was observed after 1, 7 and 14 days in animals submitted to laser therapy. However, the deposit of elastic fibers was found more precociously and the organization of collagen fibers at 14 days presented itself more accentuated. A difference regarding the presence of macrophages in the studied groups was not observed. Therefore, it may be said that low power GaAs therapeutic laser is shown to be efficient in the inflammatory process and anticipation of skin healing process in mice, however, without apparent relation to macrophagic infiltration.

Key-words: Skin. Healing. Photo therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Processo inflamatório e cicatricial na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento (coloração H.E. em aumento de 40x) 45
- Figura 2 Identificação de fibras elásticas na pele de camundongos após laserterapia em sete e 14 dias de tratamento (coloração de Verhoeff em aumento de 40x)..... 48
- Figura 3 Identificação de fibras colágenas na pele de camundongos após laserterapia em 14 dias de tratamento (coloração *picro-sirius red* em aumento de 40x) 50
- Figura 4 Identificação de macrófagos por imunistoquímica na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento 53

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Valores de p da análise da inflamação para os grupos controle e laser de um, três, sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelas médias de inflamação pelo teste de Tukey | 44 |
| Tabela 2 | Valores de p da análise de fibras elásticas para os grupos controle e laser de sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelo teste de Tukey..... | 49 |
| Tabela 3 | Valores de p da análise de fibras colágenas para os grupos controle e laser de 14 dias comparados pelo teste T não-pareado.... | 51 |
| Tabela 4 | Valores de p da análise de macrófagos para os grupos controle e laser de um, três, sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelo teste de Tukey..... | 52 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Distribuição das médias da avaliação histológica dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento 43
- Gráfico 2 Gráfico de linhas com as médias de inflamação da avaliação histológica dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento 43
- Gráfico 3 Distribuição das médias de fibras elásticas dos animais dos grupos controle e laser dos grupos sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento 49
- Gráfico 4 Distribuição das médias de fibras colágenas vermelhas e verdes dos animais dos grupos controle e laser 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento 50
- Gráfico 5 Distribuição média de macrófagos dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento 52

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----|----------------------|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferon |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| Th | T-helper |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|---|
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| CFMV | Conselho Federal de Medicina Veterinária |
| DAB | Diaminobenzidina |
| GaAlAs | Arseneto de Gálio Alumínio |
| GaAs | Arseneto de Gálio |
| GC | Grupo controle |
| GL | Grupo laser |
| H.E | Hematoxilina-eosina |
| He-Ne | Hélio-Neon |
| InGaAlP | Fosfato de arsênio índio gálio |
| LASER | Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| TGF | Fator de Crescimento e Transformação |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| α | Letra grega alfa |
| β | Letra grega beta |
| λ | Comprimento de onda |
| nm | Nanômetro |
| ® | Identificação de marca registrada |
| W | Watt |
| J/cm ² | Joule por centímetro quadrado |
| g | Gramma |
| °C | Grau centígrado |
| ml | Mililitro |
| MG | Miligrama |
| °GL | (Gay Lussac) Fração em volume |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| mm | Milímetro |
| mg/Kg | Miligrama por Quilo |
| cm | Centímetro |
| mW | Miliwatt |
| ns | Nanosegundo |
| % | Por cento |
| µm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 | Inflamação e Reparo Tecidual | 19 |
| 2.2 | O macrófago no reparo tecidual | 21 |
| 2.3 | Laserterapia de Baixa Potência | 27 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | Animais | 35 |
| 3.2 | Ferida cirúrgica | 36 |
| 3.3 | Laserterapia de Baixa Potência | 36 |
| 3.4 | Histopatologia das lesões | 37 |
| 3.5 | Imunoistoquímica | 39 |
| 3.6 | Análise estatística | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | Histomorformetria | 41 |
| 4.2 | Análise de fibras elásticas e fibras colágenas | 47 |
| 4.3 | Análise imunoistoquímica | 51 |
| 5 | DISCUSSÃO | 55 |
| 6 | CONCLUSÃO | 61 |
| | REFERÊNCIAS | 62 |
| | APÊNDICES | 74 |
| | ANEXOS | 80 |

1 INTRODUÇÃO

A pele representa um dos órgãos mais suscetíveis a lesões e precisa ser reparada para restabelecer sua estrutura e suas funções, como barreira física de proteção contra diversos estímulos ambientais e infecções e contra a perda excessiva de água (DELAVARY et al., 2011; SINGER; CLARK, 1999).

Produção e cicatrização de defeitos cutâneos são os dois eventos biológicos mais importantes na prática dermatológica (KANZLER; GORSULOWSKY; SWANSON, 1986). O principal objetivo da biologia da cicatrização de feridas é determinar como a ferida pode ser induzida a reparar o dano tissular mais rápido e mais eficientemente (SARDARI et al., 2011).

Além de fornecer uma barreira estrutural, a pele contém diversas células imunológicas que podem ser ativadas pela invasão de patógenos ou por lesões cutâneas de naturezas diversas (DELAVARY et al., 2011). Dentre estas, os macrófagos (pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear) desempenham um papel fundamental para a cicatrização (SUNDERKÖTTER et al., 1994).

Diversos estudos demonstram a influência da laserterapia de baixa potência no sistema imunológico (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; KIPSHIDZE et al., 2001; NOVOSELOVA et al., 2006), na diminuição da dor e da inflamação (BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; MARCHIONNI et al., 2010; MEDRADO et al., 2003; REIS et al., 2008), no incremento da resposta do hospedeiro à sepse (YU et al., 1997), nas terapias antimicrobiana (BHAGWANANI; BHATIA; SHARMA, 1996), antiviral (SANCHEZ et al., 2012; TARDIVO, 1989) e antitumoral (CANTI et al., 1994; CHEN et al., 2002).

A laserterapia apresenta-se como uma alternativa à terapia medicamentosa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e

necessidade de regeneração tecidual, com a vantagem de ser menos invasivo, seguro e sem efeitos colaterais (LEVINE et al., 2008).

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

Na medicina veterinária, alguns estudos demonstram a eficiência do laser de baixa potência em bovinos com lesões em tetos (GHAMSARI et al., 1996a, 1996b, 1997) e ceratoconjuntivite infecciosa bovina (MAENO et al., 1989), em equinos com lesões articulares (LINDHOLM et al., 2002), úlceras da mucosa faríngea (GOMEZ-VILLAMANDOS et al., 1995) e desordens músculo-esqueléticas dos atletas (ANTIKATZIDES, 1986) e cães com lesões nervosas e da medula espinal (ROCHKIND et al., 1988, 2007) e no tratamento pós - cirúrgico do palato (BRAEKT et al., 1991). O laser terapêutico também demonstrou resultado positivo na mobilidade espermática de cães (CORRAL-BAQUÉS et al., 2005).

Apesar de seu mecanismo de ação ainda não ter sido compreendido, esta terapia tem sido aplicada com sucesso na prática clínica (ARAÚJO et al., 2007). O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar, por meio da análise histológica e imunoistoquímica, o papel da laserterapia de baixa potência GaAs ($\lambda 904\text{nm}$) no processo de reparo tecidual em camundongos e sua relação com a formação de fibras conjuntivas e a infiltração de macrófagos, promovendo a reorganização tecidual.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inflamação e Reparo Tecidual

A inflamação é um processo dinâmico que depende de tecido viável e um fenômeno benéfico que conduz à cura (JONES; HUNT; KING, 2000). A resposta inflamatória é um instrumento que fornece fatores de crescimento e citocinas que coordenam as células e os movimentos teciduais necessários para o reparo (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; GILLITZER; GOEBELER, 2001; LEIBOVICH; ROSS, 1975; SARDARI et al., 2011; SINGER; CLARK, 1999).

O reparo tecidual em mamíferos é rápido e eficiente e seu maior objetivo consiste em cessar a hemorragia e reconstituir a barreira estrutural e funcional, prevenindo o ressecamento e a invasão de microorganismos no organismo (TORISEVA; KÄHÄRI, 2009).

A cicatrização de feridas, em condições normais nos mamíferos, consiste em três principais fases: hemostasia e inflamação, proliferação fibroblástica e reepitelização com remodelamento tecidual (BAUM; ARPEY, 2005; DELAVARY et al., 2011; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; GURTNER et al., 2008; SINGER; CLARK, 1999; TORISEVA; KÄHÄRI, 2009).

Essas fases são funcional e histologicamente distintas, porém requerem uma elaborada interação entre os diversos tipos celulares para orquestrarem uma série de eventos regulatórios e sobrepostos (BAUM; ARPEY, 2005; GURTNER et al., 2008; SINGER; CLARK, 1999; TORISEVA; KÄHÄRI, 2009).

A fase inflamatória é iniciada com a hemostasia, na qual a vasoconstrição e a adesão, agregação e degranulação plaquetárias (TORISEVA; KÄHÄRI, 2009) resultam na formação da matriz hemostática para estancar a hemorragia e secretar diversos mediadores envolvidos na cicatrização (SINGER;

CLARK, 1999). Após, ocorre uma vasodilatação ativa e um influxo na ferida de uma variedade de populações celulares inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, sendo inicialmente macrófagos e, mais tardiamente, linfócitos (DELAVARY et al., 2011; STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

A cicatrização de feridas é marcada por esta fase inflamatória que é similar, em progressão, a outras condições inflamatórias agudas (DIPIETRO, 1995). Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local do ferimento, sendo responsáveis pela limpeza da ferida e secreção de fatores que amplificam a formação do coágulo e a inflamação (TORISEVA; KÄHÄRI, 2009). Apesar da prevenção da colonização bacteriana na ferida ser importante para que ocorra um pronto reparo da área, a migração dos neutrófilos até o local não é essencial para que venham a ocorrer os processos de reparo (SIMPSON; ROSS, 1972). O influxo de macrófagos até a área da ferida é, isoladamente, o elemento mais crítico e fundamental na indução dos mecanismos de reparo (DIPIETRO, 1995; LEIBOVICH; ROSS, 1975; LUCAS et al., 2010; PARK; BARBUL, 2004; SUNDERKÖTTER et al., 1994; TORISEVA; KÄHÄRI, 2009).

Após o debridamento da ferida pelas células inflamatórias, a derme lesada começa a ganhar volume para a formação do tecido de granulação, iniciando a fase de proliferação fibroblástica (DELAVARY et al., 2011). Com a ativação de macrófagos na ferida, a elaboração de fatores de crescimento específicos e o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; JONES; HUNT; KING, 2000). Além desta fibroplasia ativa, essa fase resulta na proliferação e diferenciação de células epidérmicas, restabelecendo a integridade da epiderme (DELAVARY et al., 2011; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010), contração da ferida e neoangiogênese (DELAVARY et al., 2011).

Na fase de remodelamento tecidual, todos os processos ativados após a lesão diminuem e cessam, a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose (DIPIETRO, 1995; GURTNER et al., 2008) e ocorre involução do tecido de granulação e regeneração dérmica, formando a cicatriz (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010). Nesta fase final da cicatrização há infiltração de linfócitos-T no leito da ferida (DELAVARY et al., 2011). O processo de remodelamento representa um balanço entre as taxas de síntese de colágeno, sua degradação e seu remodelamento (BAUM; ARPEY, 2005; MONACO; LAWRENCE, 2003).

2.2 O macrófago no reparo tecidual

Desde meados de 1980, o papel desta célula como mediador de angiogênese em lesões e fibroplasia foi firmemente estabelecido e, muitos estudos avaliaram o macrófago no contexto da cicatrização de pele em modelos animais (DIPIETRO, 1995).

Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra infecções e desempenham um importante papel na indução, regulação e expressão da resposta imune (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003).

Essas células do sistema imunológico orquestram o processo de reparo cutâneo em diferentes fases (DELAVARY et al., 2011). Aumentam em número durante a fase inflamatória, tendo seu pico durante a fase de formação de tecido de granulação e declinam durante a fase de maturação (DELAVARY et al., 2011; MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

Durante essas fases da cicatrização, esses leucócitos mononucleares atuam como potentes fagócitos auxiliando os neutrófilos na captura de microorganismos e debris celulares, participando como células apresentadoras de antígenos e como estimuladores da secreção de diversos fatores de

crescimento e citocinas que são importantes na manutenção da reação inflamatória, na neoangiogênese, na síntese de colágeno e na fibrose (DELAVARY et al., 2011; DIPIETRO, 1995; MIRZA; DIPIETRO; KOH, 2009; TORISEVA; KÄHÄRI, 2009).

Os macrófagos consistem de duas populações ou subtipos, ambas com a mesma origem na medula óssea (DELAVARY et al., 2011; SUNDERKÖTTER et al., 1994).

A primeira é a de macrófagos teciduais residentes que estão presentes nos tecidos durante todo tempo e sob um estímulo apropriado são capazes de entrar em ciclo mitótico (DELAVARY et al., 2011). Após o processo de diferenciação final, os macrófagos teciduais assumem propriedades teciduais específicas como histiócitos, macrófagos alveolares, células de Kupffer, osteoclastos, macrófagos peritoneais, células da sinóvia tipo A ou micróglia (SUNDERKÖTTER et al., 1994), estes possuem uma menor importância na cicatrização (DELAVARY et al., 2011).

A outra principal população é recrutada de células precursoras hematógenas, os monócitos, derivadas de uma rápida divisão do *pool* de células na medula óssea (DELAVARY et al., 2011). Ou seja, em condições fisiológicas normais, a pele contém uma baixa densidade de macrófagos residentes em repouso ou inativados, porém durante o processo de reparo de lesões, um grande número de monócitos é recrutado para o tecido lesionado onde se diferenciam em macrófagos, aumentando a densidade destas células em cinco vezes mais que o normal (DIPIETRO, 1995).

Ao migrarem, por meio das paredes dos vasos, os macrófagos produzem enzimas que fragmentam proteínas da matriz extracelular e criam espaços para facilitar sua entrada no leito da ferida (DELAVARY et al., 2011). A ativação macrofágica implica no aumento da atividade metabólica dentro da célula,

incluindo aumento da secreção de fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios e incremento da atividade fagocítica (DIPIETRO, 1995).

O resultado da fagocitose ativa pode ser o estímulo da secreção de citocinas (DIPIETRO, 1995). Macrófagos fornecem uma fonte contínua de citocinas pró-inflamatórias importantes para o estímulo de fibroblastos e proliferação de ceratinócitos (WERNER; GROSE, 2003).

A ativação de macrófagos no leito da ferida pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo fatores derivados de plaquetas, produtos bacterianos, quando presentes, mediadores inflamatórios originados dos macrófagos e, talvez, outras células, como resposta ao próprio microambiente da lesão (DIPIETRO, 1995).

Células pertencentes à linhagem monócito-macrófago têm sido reconhecidas como heterogêneas, o que provavelmente reflete a plasticidade e versatilidade destas células em resposta à exposição aos sinais microambientais (MANTOVANI et al., 2002). Macrófagos no leito da ferida podem ter diferentes fenótipos funcionais, sendo divididos em dois grupos: M1 (ativados classicamente) e M2 (ativados alternativamente) (DELAVARY et al., 2011; MANTOVANI et al., 2002).

Os fenótipos de macrófagos influenciam no processo de cicatrização de feridas de maneiras diferentes, dependendo do microambiente em que eles exercem sua função. Ambos são essenciais para o desenvolvimento do reparo e o balanço entre os dois fenótipos é importante em diferentes fases do processo de cicatrização (DELAVARY et al., 2011).

Estudos sugerem que 1) após a fagocitose de células apoptóticas, macrófagos M1 revertem-se para macrófagos M2; 2) os macrófagos M2 derivados dos macrófagos M1 contribuem para a resolução da inflamação no processo de cicatrização de feridas; 3) a depleção de macrófagos durante a fase proliferativa prejudica significativamente a transição desta fase para a fase de

remodelamento tecidual (DELAVARY et al., 2011; GORDON, 2003; LUCAS et al., 2010; PORCHERAY et al., 2005).

Mais macrófagos M1 são necessários na limpeza de debris e para matar possíveis patógenos invasores. Por outro lado, em fases mais tardias, como quando a neoformação tecidual é mais pronunciada, macrófagos M2 podem ter um papel mais importante. No processo de cicatrização incorreto, o balanço entre os dois fenótipos nas fases do reparo é provavelmente errado (DELAVARY et al., 2011).

Os macrófagos se diferenciam em macrófagos-M1 por influência de diversos mediadores, sendo os mais importantes os produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), e citocinas inflamatórias, como o interferon (INF). Este fenótipo exibe propriedades antimicrobianas por produzirem mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , óxido nítrico e interleucina (IL)-6, e são importantes na defesa do hospedeiro, na qual as citocinas expressadas são capazes de induzir sérios danos teciduais (DELAVARY et al., 2011). Além disso, esses macrófagos são potentes células efetoras capazes de matar microorganismos e células tumorais e produzir abundantes quantidades de citocinas proinflamatórias (MANTOVANI et al., 2002).

Na ferida, sob condições normais, a população dominante aos cinco dias é de macrófagos M2 que, provavelmente, dominam a lesão em um estágio muito precoce da cicatrização, porém a fase inflamatória pode ser muito curta, em razão da ausência de produtos bacterianos ou excesso de material tecidual morto (DELAVARY et al., 2011; LUCAS et al., 2010).

Macrófagos ativados por IL-4, IL-10 ou IL-13, vitamina D3 e os hormônios glicocorticoides desenvolvem-se em M2, ativados alternativamente, que suprimem reações inflamatórias e respostas imunes adaptativas, tendo um papel importante na cicatrização de feridas, angiogênese e na defesa contra

infecções parasitárias. Também sincronizam as respostas inflamatórias e adaptivas da imunidade Th-1, limpam debris, promovem angiogênese, remodelamento tecidual e reparo (GORDON, 2003).

Os macrófagos M2 suprimem as respostas inflamatórias e adaptivas da imunidade Th-1, mas limpam debris, e promovem angiogênese, remodelamento tecidual e reparo (DELAVARY et al., 2011). Adicionalmente, eles promovem uma resposta de Th-2 que está ligada à fibrogênese (DELAVARY et al., 2011; WYNN, 2008).

Além disso, macrófagos M2 são uma importante fonte de fator de crescimento e transformação (TGF)- β , que promove inflamação, quimiotaxia, contração da ferida, angiogênese e deposição de matriz extracelular, sendo uma das mais importantes citocinas que estimula a quimiotaxia e produção de citocinas pelos macrófagos e influenciam na função dos fibroblastos de quimiotaxia e deposição de matriz extracelular (DELAVARY et al., 2011).

TGF- β é uma proteína multipotente que promove fibrose por estimular diretamente as células mesenquimais e fibroblastos (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Ela também estimula a produção de colágeno e reduz a degradação da matriz da ferida pela colagenase (DELAVARY et al., 2011).

Entretanto, além das funções benéficas, os macrófagos M2 podem também estar envolvidos em diferentes doenças, como alergias, asma e fibrose por estas doenças resultarem da resposta T-helper2, que é predominada por IL-4 ou IL-10 (GORDON, 2003).

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

Macrófagos fornecem uma fonte contínua de citocinas pró-inflamatórias importantes para o estímulo de fibroblastos e proliferação de ceratinócitos (WERNER; GROSE, 2003). O resultado da fagocitose ativa pode ser o estímulo da secreção de citocinas (DIPIETRO, 1995).

Cohen, Danon e Roth (1987) estudaram o processo de reparo cutâneo em camundongos relacionando-o com a idade e a função dos macrófagos. Em camundongos jovens, a cicatrização da ferida foi mais rápida que em camundongos maduros ou senis. Não houve diferença significativa na comparação entre camundongos maduros e senis. Adicionalmente, os camundongos jovens, após a administração local de soro anti-macrófago, apresentaram um retardo no processo de cicatrização de feridas ao compará-lo com camundongos senis, sugerindo que a funcionalidade dos macrófagos também tem um importante papel no processo de reparo.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Danon, Kowatch e Roth (1989) aplicaram injeções intraperitoneais de macrófagos em camundongos e observaram que o processo de cicatrização de feridas foi acelerado, especialmente quando estas células eram obtidas de animais jovens. Assim, concluíram que deficiências na função macrofágica de indivíduos senis poderiam prejudicar o processo de reparo tecidual e, além disso, sugeriram os macrófagos como uma possibilidade terapêutica nos processos de reparo.

Estudos sugerem que a cicatrização normal de feridas pode ocorrer na ausência de polimorfonucleares e outros leucócitos, mas os monócitos precisam obrigatoriamente estar presentes para que o reparo ocorra normalmente (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

2.3 Laserterapia de Baixa Potência

O conceito da utilização da luz para propósitos terapêuticos, denominado fototerapia, tem origem nas crenças de que o sol e outras fontes de luz, como as luzes infravermelha e ultravioleta apresentam benefícios terapêuticos (LEVINE et al., 2008).

O primeiro feixe de luz de laser ¹ foi produzido em 1960 à base de Cristal Ruby, por Theodore Maiman, com comprimento de onda (λ) de 694nm (MIKAIL; PEDRO, 2006). Desde então, vários aparelhos de laser, baseados no protótipo original, encontraram aplicações diversas, desde simples leitores de códigos de barras até dispositivos militares (KITCHEN; BAZIN, 1998). A partir de 1970, as pesquisas se intensificaram, possibilitando a utilização de outras substâncias radioativas e a fabricação dos aparelhos de laser (BAXTER, 1994).

O laser representa um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa que produzem um feixe de luz, quando excitadas por uma fonte de energia (SILVA et al., 2010).

Durante os anos de 1960 e 1970, os lasers foram considerados destrutivos, todavia, na atualidade foram reconhecidos como lasers de alta potência ou cirúrgicos, com propriedades fototérmicas e abrasivas, usados rotineiramente para cortar e destruir tecidos (WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009).

Em seguida, foram reconhecidas as propriedades terapêuticas da relativa baixa potência pela irradiação de lasers atômicos, sendo estes referidos como lasers terapêuticos (WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009), de baixa potência,

¹ A palavra “laser” é um acrônimo para o termo em inglês “**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation”, com tradução em português de Luz Amplificada pela Emissão Estimulada da Radiação (TUNÉR; HODE, 2010; WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009).

apresentando propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (SILVA et al., 2010).

Incluem-se nesta última categoria, basicamente dois tipos de lasers, o hélio-neônio (He-Ne), com comprimento de onda de 633nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha) e lasers diodo, como o Arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), Arseneto de gálio (GaAs) e o Fosfato de arsênio índio gálio (InGaAlP), cujos comprimentos de onda variam entre 633 e 904 nm (KREISLER et al., 2003; TUNÉR; HODE, 2010).

Os lasers podem ser contínuos ou pulsáteis. Sua potência é expressa em watts (W), variando de deciwatts a megawatts e a energia medida em joules por centímetro quadrado (J/cm^2), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação (DALLAN; OLIVEIRA, 2000).

O mecanismo de ação do laser de baixa potência ainda não foi compreendido e os resultados de diversos estudos são controversos, pois não se consideram parâmetros como comprimento de onda, dose e intensidade (IYOMASA et al., 2009). Todavia, esta terapia tem sido aplicada com sucesso na prática clínica (ARAÚJO et al., 2007).

As alterações biológicas produzidas pelo laser de baixa potência não ocorrem por estímulo térmico (BABAPOUR; GLASSBERG; LASK, 1995). Uma das hipóteses é que o mecanismo de bioestimulação celular pelo laser pode ocorrer em nível mitocondrial (PASTORE; GRECO; PASSARELLA, 2000), onde se encontra a maioria dos cromóforos (SALET; PASSARELLA; QUAGLIARIELLO, 1987).

O processo de fotoestimulação ocorre quando a luz irradiada no tecido é absorvida por cromóforos específicos, sendo convertida em energia metabólica, o que ativa a cadeia respiratória, alterando o metabolismo e promovendo transdução de sinais em outras partes da célula e interferência em processos

oxidativos (HILLENKAMP, 1989; HU et al., 2007; KARU, 1996; KARU; ANDREICHUCK; RYABYKH, 1993).

A ativação do transporte de elétrons na cadeia respiratória resulta em aumento no potencial elétrico, por meio da membrana mitocondrial, um aumento no *pool* de adenosina trifosfato (ATP) e, finalmente, na ativação da síntese de ácido nucleico (YU et al., 1997).

O principal efeito biológico do laser de baixa potência é a ativação da produção e as alterações no comportamento bioquímico das moléculas de ATP, importantes na biologia porque representam o estoque químico de energia (AMAT et al., 2004; PARKER, 2007).

As respostas fotobiológicas resultam de mudanças fotoquímicas e/ou fotofísicas produzidas pela absorção de radiação eletromagnética não-ionizante (SMITH, 1991). A luz do laser He-Ne pode causar alterações celulares fisiológicas e pode ter efeitos fotobiomodulatórios na proliferação celular (HU et al., 2007).

Recentemente, houve um aumento de interesse no uso da irradiação do laser de baixa potência vermelho e infravermelho para acelerar cicatrização de feridas e regeneração tecidual (ARAÚJO et al., 2007).

Experimentos têm demonstrado a eficácia da fototerapia pelo laser em acelerar o reparo de tecidos como a pele (MEDRADO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2006; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 2001; REIS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2004), músculos (BIBIKOVA; ORON, 1994; IYOMASA et al., 2009; WEISS; ORON, 1992), tendões (RAISER et al., 2003; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; SCHMITT et al., 1993; WANDERER et al., 1994), ligamentos (FUNG et al., 2003), cartilagem e ossos (AKAI et al., 1997; TRELLES; MAYAYO, 1987). Adicionalmente, há estudos confirmando a melhora da regeneração nervosa com o uso do laser de baixa potência (BAE et al., 2004; SHAMIR et al., 2001).

Estudos demonstram que a irradiação pelo laser de baixa potência pode promover proliferação celular, síntese de colágeno e produção de fatores de crescimento pelas células (SOMMER et al., 2001).

Yamamoto et al. (1996) realizaram um estudo com fibroblastos humanos e descreveu que o laser de baixa potência estimula a proliferação fibroblástica e síntese de colágeno por meio de mecanismos como alterações bioquímicas nas propriedades enzimáticas e um concomitante aumento da atividade celular pelo estímulo da síntese de ATP.

Iyomasa et al. (2009) utilizaram o laser vermelho e concluíram que a terapia contribuiu para o reparo muscular em gerbil, por meio da ativação de fibroblastos, macrófagos, células capilares endoteliais e fibras musculares.

Em estudo comparativo entre os efeitos do laser e do ultrassom terapêutico em cicatrização de tendão calcâneo comum de ratos da linhagem *Swiss*, Demir et al. (2004) observaram que houve aceleração da cicatrização com o primeiro método e ausência de eficácia na associação dos métodos utilizados.

Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (1998) descreveram um acréscimo de 26% na concentração de colágeno em tendões de coelhos tratados com laser terapêutico em comparação ao grupo controle, quando aplicado diariamente após tenotomia e reparo cirúrgico. O aumento da concentração de colágeno e a liberação de fatores de crescimento dos fibroblastos foram correlacionados com uma melhora na cicatrização tendínea.

Pacientes humanos com tendinite que utilizaram o laser de baixa potência apresentaram redução da inflamação e dor (BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006). Em cães, Schmitt et al. (1993) verificaram que tendões calcâneos de cães irradiados com Laser AsGa apresentaram melhor vascularização, menos aderência e cicatrização com melhor aparência estética. Wanderer et al. (1994) descreveram que esses mesmos tendões irradiados

apresentavam fibroblastos com alta síntese proteica e fibras colágenas mais organizadas na matriz extracelular.

Ribeiro et al. (2004) demonstraram que a irradiação do laser vermelho em peles com lesão por queimaduras acelerou a reepitelização promovendo um fechamento mais rápido da ferida.

Hopkins et al. (2004) utilizaram a laserterapia na cicatrização de feridas superficiais em pacientes humanos, revelando um aumento da contração da ferida com aceleração de sua cicatrização. Adicionalmente, foi detectada a facilitação da cicatrização de outras feridas no membro que não havia sido irradiado diretamente por laser, sugerindo um efeito indireto de seus benefícios em tecidos adjacentes.

Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (2001) utilizaram o laser, durante cinco dias por semana, durante aproximadamente três semanas, em feridas cirúrgicas induzidas na pele de ratos diabéticos. Nesse estudo, o laser acelerou o processo de reparo tecidual, sendo evidente o incremento à síntese de colágeno.

Em trabalho *in vitro*, com cultura de celular humana, foi demonstrado que o laser vermelho aumentou a migração de ceratinócitos epidérmicos e proliferação e granulação tecidual, por estimular a expressão de IL-1 α e IL-8 promovendo uma reepitelização mais rápida (YU et al., 1996).

Araújo et al. (2007) descreveram que a radiação pelo laser vermelho acelerou a cicatrização de feridas pelo estímulo de atividades biológicas e diferenciação de fibroblastos e por reduzir o processo inflamatório.

O mecanismo dos efeitos imunomodulatórios induzidos pelo laser de baixa potência *in vivo* ainda não está compreendido, todavia, alguns estudos forneceram evidências das atividades imunomodulatórias desta fototerapia (ARAÚJO et al., 2007; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; KIPSHIDZE et al., 2001; NOVOSELOVA et al., 2006; SHIROTO et al., 1989; ZHENG et al., 1992).

Young, Dyson e Bolton (1990) sugerem que alguns destes efeitos positivos podem ser atribuídos ao aumento da permeabilidade das membranas celulares aos íons de cálcio.

Araújo et al. (2007) sugeriram que a irradiação pelo laser inibe a resposta inflamatória, pois observaram um precoce desaparecimento dos neutrófilos e necrose no primeiro dia de lesão e um menor número de macrófagos e discreto edema dias mais tarde.

Kipshidze et al. (2001) descreveram um incremento na produção de fator de crescimento endotelial vascular e promoção de crescimento de células endoteliais *in vitro* por ação do laser vermelho.

Novoselova et al. (2006) observaram que a produção de IL-2 aumentou significativamente e houve acúmulo dessa citocina no plasma sanguíneo 24 horas após uma única aplicação do laser. Adicionalmente, os autores estudaram que o principal marcador de estresse, a proteína Hsp70 (proteína de choque térmico), é expressa com apenas uma única irradiação do laser vermelho na superfície da pele de camundongos, indicando sua alta sensibilidade ao laser de baixa potência.

Para entender os efeitos celulares do laser de baixa potência, diversos estudos têm sido desenvolvidos em células imunocompetentes, tais quais linfócitos e macrófagos (BERKI; NÉMETH; HEGEDŰS, 1988; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; FUNK; KRUSE; KIRCHNER, 1993; KLEBANOV et al., 1998; LUZA; HUBÁČEK, 1996; YOUNG et al., 1989; ZHENG et al., 1992).

Estudos com linfócitos demonstraram que a irradiação com laser He-Ne promove incremento na secreção de imunoglobulinas (BERKI; NÉMETH; HEGEDŰS, 1988), produção de citocinas (FUNK; KRUSE; KIRCHNER, 1993), atividade fagocítica (LUZA; HUBÁČEK, 1996) e priming de leucócitos (KLEBANOV et al., 1998). Todavia, Novoselova et al. (2006) descreveram que

a produção de TNF- β pelos infócitos T não apresentou diferença significativa entre animais irradiados com laser e não irradiados.

O mecanismo dos efeitos produzidos pela luz vermelha nos macrófagos não é claramente compreendido (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003). Todavia, diversos estudos *in vitro* (ZHENG et al., 1992) e *in vivo* (ARAÚJO et al., 2007; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; NOVOSELOVA et al., 2006; ZHENG et al., 1992) demonstraram que a laserterapia de baixa potência tem efeito positivo no estímulo da atividade de macrófagos.

A irradiação pelo laser vermelho He-Ne tem a capacidade de promover estímulo à atividade macrofágica e aumentar a atividade fagocítica (BERKI; NÉMETH; HEGEDŰS, 1988; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; ZHENG et al., 1992). Nesses estudos, foram encontrados aumento da atividade dos marcadores de estimulação de macrófago, como catepsina (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003), quantidade de lisozima (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; ZHENG et al., 1992) e atividade da fosfatase ácida na lisozima (ZHENG et al., 1992). Lisozima e catepsina são enzimas que regulam os mecanismos celulares citotóxicos (BERKI; NÉMETH; HEGEDŰS, 1988; ZHENG et al., 1992).

Trabalhos *in vitro* demonstraram que macrófagos irradiados com laser produzem fatores de crescimento capazes de modular a proliferação fibroblástica (RAJARATNAM; BOLTON; DYSON, 1994; YOUNG et al., 1989).

Young et al. (1989) também descreveram a ação do laser vermelho no estímulo à produção de fatores de crescimento pelos macrófagos. Em contrapartida, nos estudos de Novoselova et al. (2006) houve inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais, assim como a produção de óxido nítrico pelos macrófagos também não apresentou diferença significativa entre os animais tratados pelo laser e os que não receberam esta terapia.

Novoselova et al. (2006) estudaram que as exposições excessivas ao laser diminuíram a quantidade de Hsp70, demonstrando depleção da resposta

celular adaptiva sobre influência de doses cumulativas. Efeitos similares foram observados na produção de óxido nítrico e IL-2. Ao observarem que a irradiação, durante um período de 30 dias induziu a forte imunodepressão, acompanhada pela redução na concentração de citocinas plasmáticas e na habilidade dos macrófagos, em produzir óxido nítrico, os autores sugeriram que o laser de baixa potência deve ser sempre usado com cautela, pois pode ser um eficiente modulador, indicado como ferramenta não-invasiva na imunoterapia, tanto quanto pode suprimir a resposta imune, quando seu uso for prolongado, sendo então indicado apenas em patologias auto-imunes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi conduzido atendendo aos princípios éticos para salvaguardar o bem-estar do animal e minimizar o desconforto, sendo aprovado de acordo com protocolo nº 048/11 do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Anexo A).

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

Após a adaptação de cinco dias, em dieta padrão preparada com base nas recomendações da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990), os animais foram randomicamente distribuídos em oito grupos de oito animais, onde quatro grupos foram submetidos à laserterapia de baixa potência e quatro mantidos sem o tratamento, a saber:

- a) **Grupo-Controle um dia (GC1):** avaliação da lesão um dia após, com tratamento placebo;
- b) **Grupo-Laser um dia (GL1):** avaliação da lesão um dia após, com uma aplicação de laser;
- c) **Grupo-Controle três dias (GC3):** avaliação da lesão três dias após, com tratamento placebo;
- d) **Grupo-Laser três dias (GL3):** avaliação da lesão três dias após, com três aplicações de laser;

- e) **Grupo-Controle sete dias (GC7)**: avaliação da lesão sete dias após, com tratamento placebo;
- f) **Grupo-Laser sete dias (GL7)**: avaliação da lesão sete dias após, com sete aplicações de laser;
- g) **Grupo-Controle 14 dias (GC14)**: avaliação da lesão 14 dias após, com tratamento placebo;
- h) **Grupo-Laser 14 dias (GL14)**: avaliação da lesão 14 dias após, com quatorze aplicações de laser.

3.2 Ferida cirúrgica

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

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

Na sequência, provocou-se uma ferida nesta região com o uso de um *punch* de quatro mm de diâmetro. Os animais receberam analgesia com dipirona (Analgex V[®], Agener União) aplicada por via intramuscular na face externa da coxa, em dose única de 50mg/Kg.

3.3 Laserterapia de Baixa Potência

Durante a terapêutica, os animais foram imobilizados com auxílio de um dispositivo confeccionado em tubo Falcon[®], constante de um tubo sem saída de 4,5cm de diâmetro e dotados de uma perfuração anterior para aeração e de uma

janela superior, onde permaneceu exposta a região da lesão (PEREIRA, 2001) na qual a probe do laser foi posicionada de forma perpendicular e apoiada diretamente sobre a ferida, protegida por papel filme (transparente) para evitar a contaminação da mesma.

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

Segundo Tunér e Hode (2010), para cálculo da dose (D), expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm²), considera-se:

$$D = \frac{P \times t}{A} \quad [\text{J/cm}^2].$$

em que, P = potência de saída do laser em watts; t = duração do tratamento em segundos; A= área a ser tratada em cm².

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

3.4 Histopatologia das lesões

Após o período experimental, previamente estabelecido para cada grupo, os animais foram submetidos a 12 horas de jejum e, em seguida, anestesiados e eutanasiados por aprofundamento da anestesia geral, seguindo as diretrizes relativas ao tópico e padronizadas pela Associação Brasileira de Bioterismo, de

acordo com os procedimentos e princípios éticos da resolução N° 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (2002).

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

Os cortes e as etapas de preparação, colorações e análises das lâminas foram realizados no Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

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

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

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

imaturo e fibras verdes, que representam colágeno maduro (FERREIRA et al., 2003).

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

3.5 Imunoistoquímica

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

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

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

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

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

3.6 Análise estatística

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

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

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

4 RESULTADOS

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

Macroscopicamente, nos animais dos grupos tratados e não tratados, notou-se o fechamento completo da lesão aproximadamente ao 10º dia. Neste período, a maioria dos animais do grupo controle apresentava início de crescimento de pelos, enquanto os animais do grupo laser apresentavam pelos recobrando quase toda a área da ferida. No 11º dia, a área das lesões dos animais do grupo laser estava completamente recoberta por pelos, diferente do grupo controle (APÊNDICE D).

4.1 Histomorformetria

Nos grupos de animais com um dia de lesão, observou-se a destruição tecidual com infiltrado inflamatório polimorfonuclear intenso e mononuclear moderado (Figura 1A; Figura 1B). A inflamação foi mais acentuada no GC e a diferença entre as médias do GC 1 e o GL1 (Gráfico 1) foi considerada significativa estatisticamente (Tabela1). A fibrina, quando presente, estava concentrada na superfície da lesão com coloração fortemente eosinofílica.

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

Aos três dias após lesão, observaram-se, ainda, sinais de inflamação aguda na derme, com infiltração intensa de polimorfonucleares e moderada de mononucleares, com células íntegras e degeneradas (Figura 1C; Figura 1D). A

inflamação apresentava-se discretamente maior no GL3, porém, sem diferença significativa do mesmo em relação ao GC3 (Tabela 1).

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

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

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

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

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

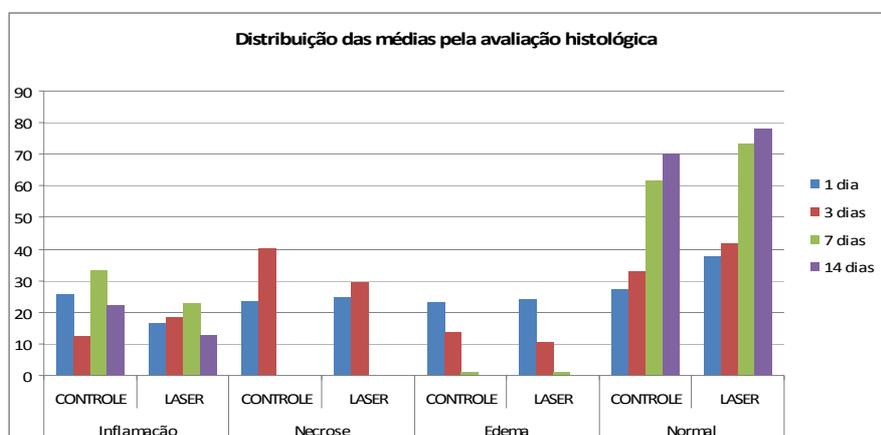


Gráfico 1 Distribuição das médias da avaliação histológica dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento

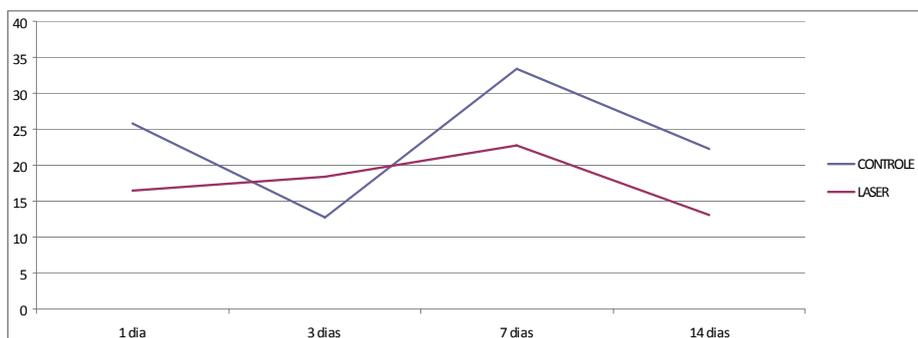


Gráfico 2 Gráfico de linhas com as médias de inflamação da avaliação histológica dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento

Tabela 1 Valores de p da análise da inflamação para os grupos controle e laser de um, três, sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelas médias de inflamação pelo teste de Tukey

| Valores de p – Inflamação | | | | |
|----------------------------------|-------------------|--------------|----------------|----------------------|
| | Inflamação | Edema | Necrose | Tecido Normal |
| 1 Dia | p=0,0029* | p=0,8910 | p=0,7894 | p=0,1764 |
| 3 Dias | p=0,0630 | p=0,4249 | p=0,1841 | p=0,3271 |
| 7 Dias | p=0,0378* | p=0,7218 | -- | p=0,0136* |
| 14 Dias | p=0,0378* | -- | -- | p=0,0144* |
| 1x3x7x14 Dias (GC) | p<0,0001 | -- | -- | -- |
| 1x3x7x14 Dias (GL) | p=0,0530 | -- | -- | -- |

*diferença estatística significativa

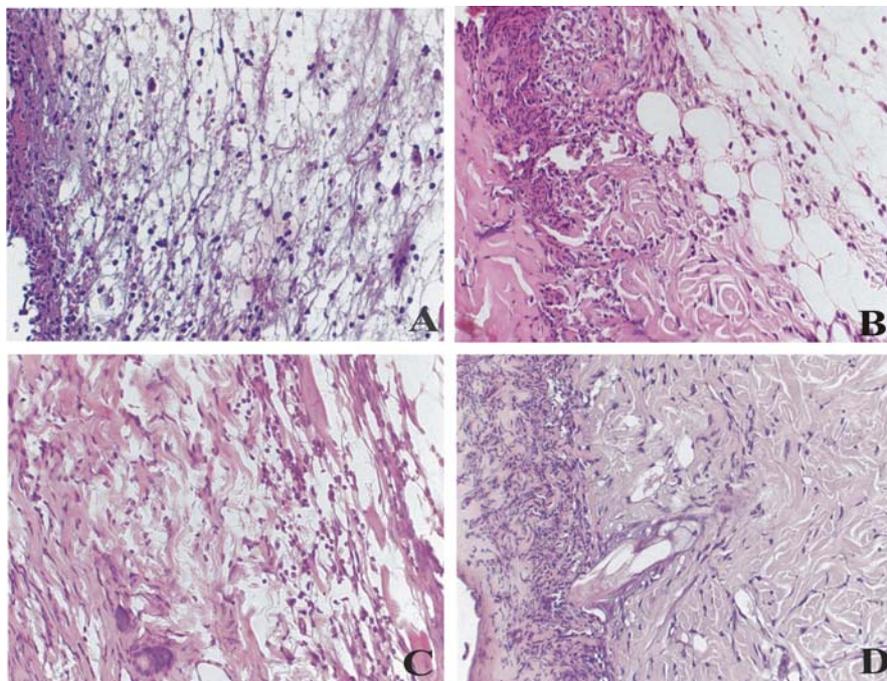


Figura 1 Processo inflamatório e cicatricial na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento (coloração H.E. em aumento de 40x) (...continua...)

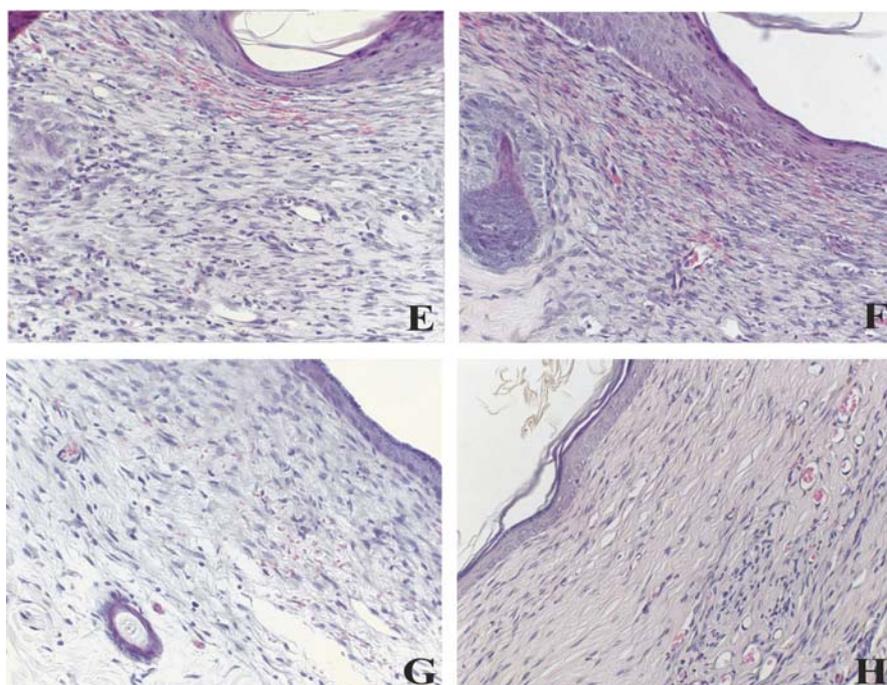


Figura 1 Processo inflamatório e cicatricial na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento (coloração H.E. em aumento de 40x)

Nota: A) Lesão de um animal do GC1. Nota-se presença de intenso infiltrado inflamatório por toda área da lesão, áreas de edema e necrose. B) Lesão de um animal do GL1. Presença de intenso infiltrado inflamatório por toda área da lesão, áreas de edema e necrose mais discretas do que no GC. C) Lesão de um animal do GC3. Desorganização do colágeno, presença de intenso infiltrado inflamatório na derme, áreas de edema e necrose. D) Lesão de um animal do GL3. Maior organização do colágeno, presença de intenso infiltrado inflamatório na crosta e na derme, mínimas áreas de edema e necrose. E) Lesão de um animal do GC7. Presença de tecido de granulação e reepitelização completa. Nota-se ainda presença de infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos. Raras áreas de edema e ausência de necrose. F) Lesão de um animal do GL7. Presença de tecido de granulação e reepitelização completa com epiderme espessa. Nota-se ainda presença de infiltrado inflamatório na derme, angiogênese mais evidente, fibroblastos, fibrócitos e folículo piloso. G) Lesão de um animal do GC14. Reepitelização completa, presença de pouco infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos e folículo piloso. H) Lesão de um animal do GL14. Presença de reepitelização completa com deposição de estrato córneo, infiltrado inflamatório na derme, angiogênese, fibroblastos e fibrócitos.

4.2 Análise de fibras elásticas e fibras colágenas

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

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

A comparação evolutiva da formação de fibras elásticas entre os grupos controles (GC7 e GC14) demonstrou diferença estatística significativa (Tabela 2), diferente da comparação para os grupos tratados com laser (GL7 e GL14), nos quais não existiu diferença significativa (Tabela 2).

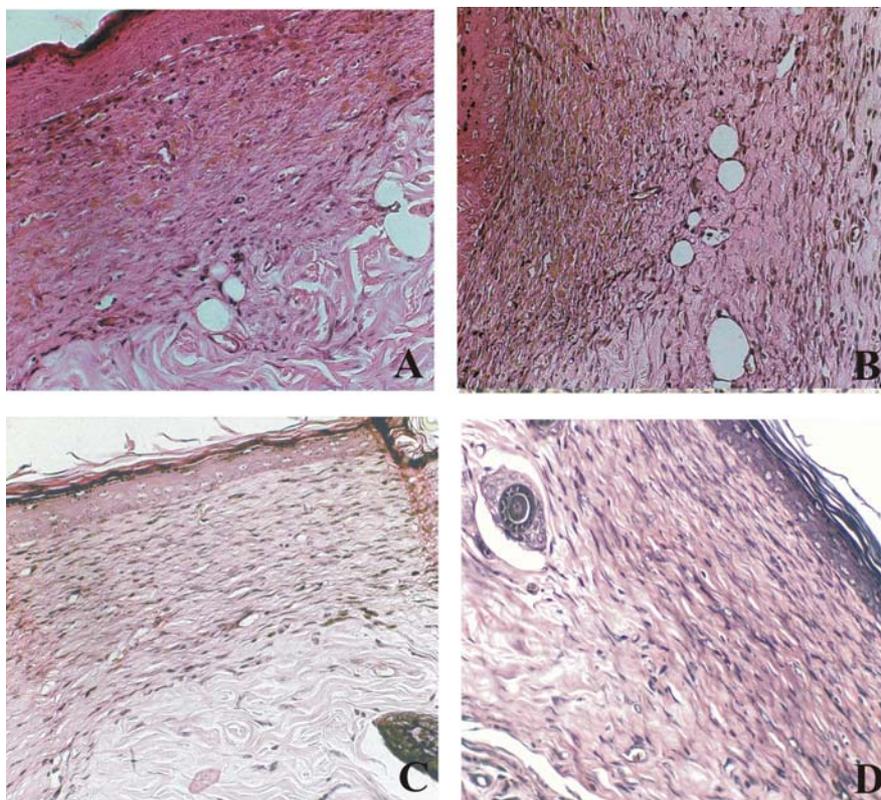


Figura 2 Identificação de fibras elásticas na pele de camundongos após laserterapia em sete e 14 dias de tratamento (coloração de Verhoeff em aumento de 40x)

Nota: A) Lesão de um animal do GC7. Nota-se menor expressão de fibras elásticas. B) Lesão de um animal do GL7. Há maior expressão de fibras elásticas a sua presença no tecido de granulação. C) Lesão de um animal do GC14. Nota-se reepitelização com pouca expressão de fibras elásticas e presença destas na área da cicatriz. D) Lesão de um animal do GL14. Nota-se uma maior expressão de fibras elásticas.

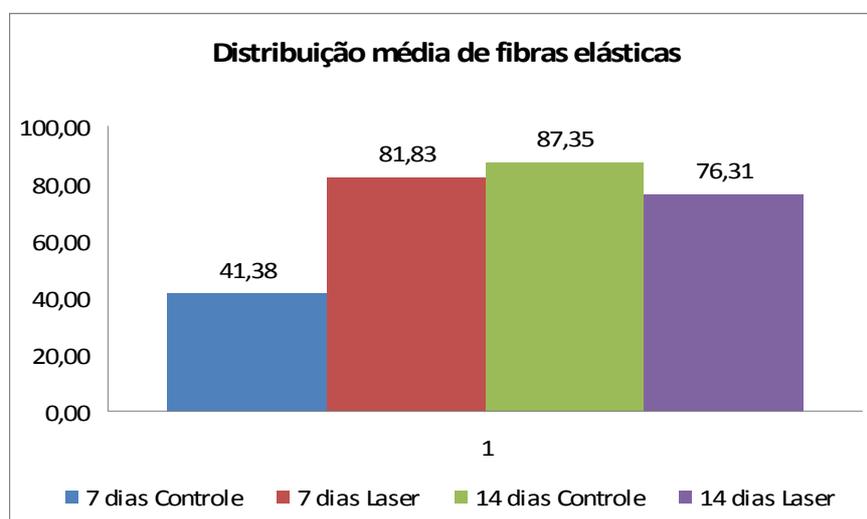


Gráfico 3 Distribuição das médias de fibras elásticas dos animais dos grupos controle e laser dos grupos sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento

Tabela 2 Valores de p da análise de fibras elásticas para os grupos controle e laser de sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelo teste de Tukey

| Valores de p – Fibras elásticas | |
|--|----------|
| 7 Dias | p=0,006* |
| 14 Dias | P=0,53 |
| 7x14 Dias (GC) | p=0,008* |
| 7x14 Dias (GL) | p=0,7308 |

*diferença estatística significante

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

Na avaliação de fibras colágenas, os animais controle demonstraram uma quantidade discretamente menor de fibras vermelhas tal qual maior de fibras verdes (Gráfico 4), sem qualquer diferença estatística (Tabela 3).

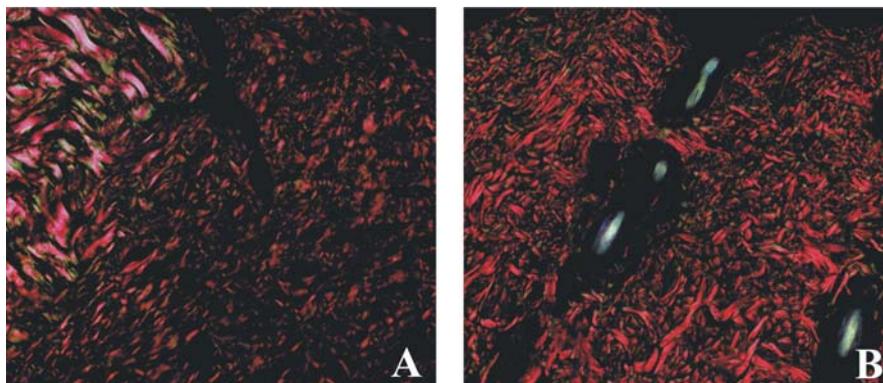


Figura 3 Identificação de fibras colágenas na pele de camundongos após laserterapia em 14 dias de tratamento (coloração *picro-sirius red* em aumento de 40x)

Nota: A) Lesão de um animal do GC14. Nota-se uma menor expressão de fibras colágenas imaturas e mínima quantidade de fibras maduras no lado esquerdo da figura, no qual se observa tecido normal. B) Lesão de um animal do GL14. Há maior expressão de fibras colágenas imaturas com tendência à organização e ausência de fibras maduras (Coloração *picro-sirius red*; aumento de 40x).

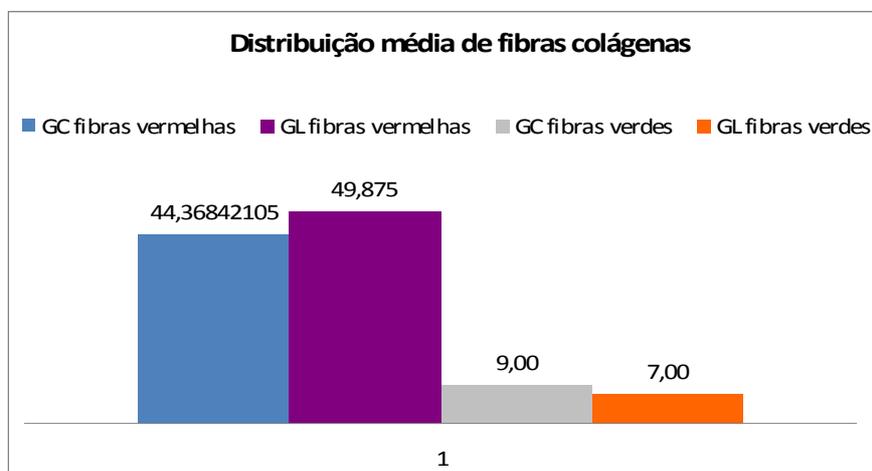


Gráfico 4 Distribuição das médias de fibras colágenas vermelhas e verdes dos animais dos grupos controle e laser 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento

Tabela 3 Valores de p da análise de fibras colágenas para os grupos controle e laser de 14 dias comparados pelo teste T não-pareado

| Valores de p – Fibras colágenas | | |
|--|-------------------------|----------------------|
| | Fibras vermelhas | Fibras verdes |
| 14 Dias | p=0,2714 | p=0,4870 |

4.3 Análise imunoistoquímica

Na avaliação imunoistoquímica, observou-se um menor índice médio de macrófagos no GL1 quando comparado ao GC1 (Gráfico 5), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

A média de macrófagos foi muito semelhante nas lesões dos animais do GC3 e GL3 (Gráfico 5), não havendo diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Em relação aos grupos de sete dias após a lesão, a média de macrófagos foi discretamente maior no GC7 do que no GL7 (Gráfico 5), todavia sem diferença significativa (Tabela 4).

Aos 14 dias após a lesão, na avaliação imunoistoquímica, a média de macrófagos foi maior no grupo de animais não submetidos ao tratamento (GC14) (Gráfico 5), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

Realizando a comparação evolutiva da deposição de macrófagos entre os grupos controles (GC1, GC3, GC7 e GC14), não houve diferença estatística significativa (Tabela 4), porém notou-se um número maior de macrófagos no primeiro dia após a lesão e sua redução gradual. Comparando evolutivamente os grupos tratados com laser (GL1, GL3, GL7 e GL14), observou-se que os macrófagos aparecem no primeiro dia no leito da lesão, aumentam no terceiro dia e reduzem apenas no sétimo e décimo quarto dias, sendo essa redução não significativa estatisticamente (Tabela 4).

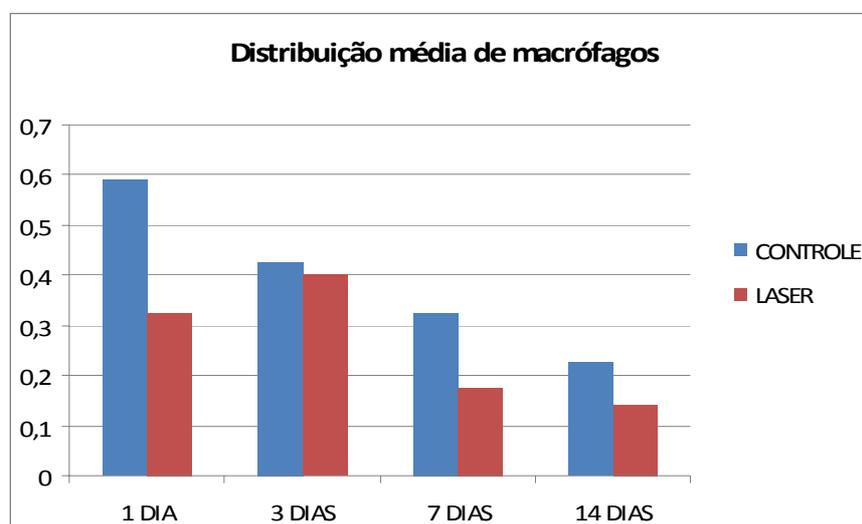


Gráfico 5 Distribuição média de macrófagos dos animais dos grupos controle e laser um, três, sete e 14 dias após realização da ferida cirúrgica e instituição do tratamento

Tabela 4 Valores de p da análise de macrófagos para os grupos controle e laser de um, três, sete e 14 dias comparados pelo teste T não-pareado e para os grupos comparados evolutivamente pelo teste de Tukey

| Valores de p – Macrófagos | |
|----------------------------------|-----------|
| 1 Dia | p= 0.3996 |
| 3 Dias | p= 0.9490 |
| 7 Dias | p= 0.4156 |
| 14 Dias | p= 0.5153 |
| 1x3x7x14 Dias (GC) | p= 0.0637 |
| 1x3x7x14 Dias (GL) | p= 0.6362 |

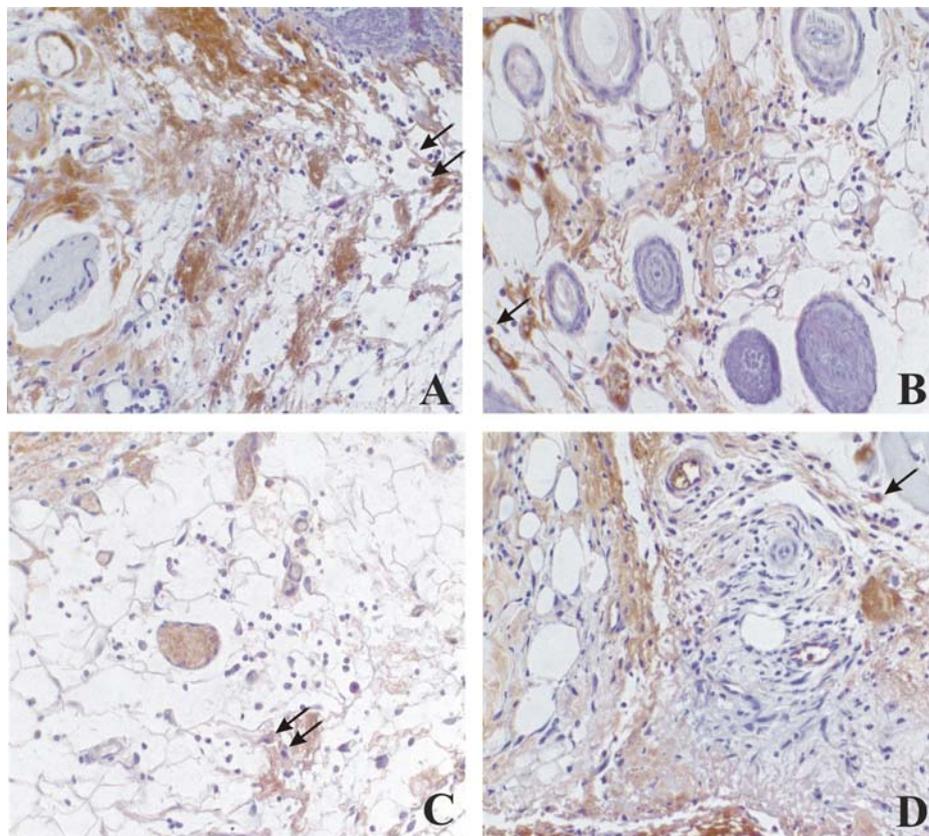


Figura 4 Identificação de macrófagos por imunohistoquímica na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento (...continua...)

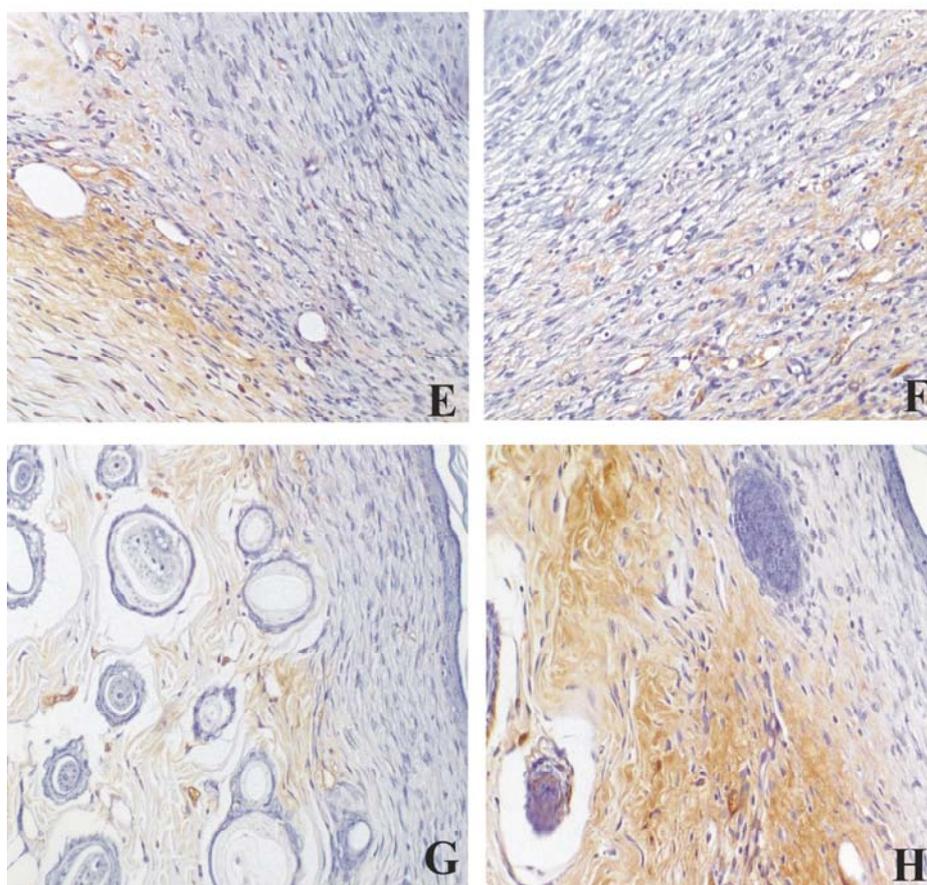


Figura4 Identificação de macrófagos por imunohistoquímica na pele de camundongos após laserterapia em um, três, sete e 14 dias de tratamento

Nota: A) Lesão de um animal do GC1. Nota-se a presença de macrófagos indicados na seta. B) Lesão de um animal do GL1. Presença de único macrófago (seta). C) Lesão de um animal do GC3. Nota-se a presença de dois macrófagos indicados na seta. D) Lesão de um animal do GL3. Há presença de um macrófago (seta). E) Lesão de um animal do GC7. Ausência de macrófagos. F) Lesão de um animal do GL7. Observa-se ausência de macrófagos. G) Lesão de um animal do GC14. Não há presença de macrófago. H) Lesão de um animal do GL14. Ausência de macrófagos.

5 DISCUSSÃO

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

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

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

O mecanismo dos efeitos no sistema imunológico induzidos pelo laser de baixa potência *in vivo* ainda não está compreendido, mas alguns estudos forneceram evidências das atividades imunomodulatórias desta fototerapia (ARAÚJO et al., 2007; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; KIPSHIDZE et al.,

2001; NOVOSELOVA et al., 2006; SHIROTO et al., 1989; ZHENG et al., 1992).

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

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

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

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

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

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

Pugliese et al. (2003) descreveram uma expressão similar das fibras elásticas ao 7º e 14º dias nos animais do grupo controle e grupo tratado com dose única de laser GaAlAs ($\lambda 670\text{nm}$) em lesões experimentais no dorso de ratos *Wistar*, nas fluências de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$. Esses resultados diferem parcialmente dos encontrados no presente estudo, pois foi observada diferença estatisticamente significativa nos animais dos grupos de sete dias, com quantidade acentuada de fibras no grupo laser. Todavia, aos 14 dias,

ambos os grupos apresentavam valores de média semelhantes estatisticamente. Assim sendo, o laser pode auxiliar no processo de formação precoce de fibras elásticas. Embora não existam dados na literatura que indiquem uma possível ação bioestimulante do laser sobre as fibras elásticas nestes períodos, uma vez que a síntese das fibras elásticas é um evento que ocorre cronologicamente mais tarde em comparação com as fibras de colágeno, seria possível encontrar diferenças mais acentuadas entre os grupos se o período estudado fosse prorrogado para 21 a 30 dias (PUGLIESE et al., 2003).

Pugliese et al. (2003) concluíram que a terapia a laser de baixa potência parece aumentar a expressão e organização de fibras colágenas em lesões de pele de ratos, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa estatisticamente entre os grupos controle e tratado com laser. Para Araújo et al. (2007), a irradiação pelo laser aparenta ter um efeito na organização das fibrilas de colágeno no compartimento extracelular e os efeitos benéficos desta terapia foram particularmente distinguíveis nos dias oito e 15 após lesão. Mendez et al. (2004) também relataram uma maior deposição de colágeno nos animais que receberam laserterapia. Todos esses resultados corroboram com o do presente estudo, pois embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa, observou-se maior expressão das fibras colágenas, com maior tendência à organização no grupo de animais que receberam a terapia a laser 14 dias após a lesão experimental e a instituição do tratamento.

O aumento na expressão e organização das fibras colágenas e elásticas pode ocorrer, segundo Novoselova et al. (2006), em virtude do notável efeito da irradiação do laser na biologia dos fibroblastos. Os autores demonstraram que aos oito dias após a lesão, os fibroblastos das lesões irradiadas possuíam sinais de alta síntese de proteínas e secreção, além de muitos fagossomos contendo colágeno, indicando compromisso com a degradação da matriz extracelular danificada. A fagocitose das fibras colágenas foi claramente notada nas lesões

irradiadas. Outro estudo demonstrou que as dermes das feridas irradiadas continham fibroblastos grandes e ativados, assim como maior número de miofibroblastos. Adicionalmente, observaram que os fibroblastos dos animais irradiados demonstraram um alto número de fagossomos contidos no colágeno quando comparados com os fibroblastos dos animais não irradiados (ARAÚJO et al., 2007).

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

No presente estudo foi evidente o menor número de macrófagos nos grupos tratados pela laserterapia em todos os períodos avaliados. Estudos demonstram que o laser terapêutico de baixa potência promove estímulo à atividade macrofágica e aumento da atividade fagocítica (BERKI; NÉMETH; HEGEDÜS, 1988; DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; ZHENG et al., 1992). Nesses estudos, foram encontrados aumento da atividade dos marcadores de estimulação de macrófago, como catepsina (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003), quantidade de lisozima (DUBE; BANSAL; GUPTA, 2003; ZHENG et al., 1992) e atividade da fosfatase ácida na lisozima (ZHENG et al., 1992). Lisozima e

catepsina são enzimas que regulam os mecanismos celulares citotóxicos (BERKI; NÉMETH; HEGEDÜS, 1988; ZHENG et al., 1992). Outros trabalhos *in vitro* demonstraram que macrófagos irradiados com laser produzem fatores de crescimento capazes de modular a proliferação fibroblástica (RAJARATNAM; BOLTON; DYSON, 1994; YOUNG et al., 1989). Assim, a quantidade de macrófagos pode ser menos importante que a funcionalidade destas células durante o processo de reparo tecidual.

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

- AKAI, M. et al. Lasers effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: an experiment with animal model. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 21, n. 5, p. 480-484, May 1997.
- AMAT, A. et al. Effect of red and near-infrared laser light on adenosine triphosphate (ATP) in the luciferase reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 168, n. 1/2, p. 59-65, Nov. 2004.
- ANTIKATZIDES, T. G. Soft laser treatment of musculoskeletal disorders in the equine athlete. **Equine Practice**, Santa Barbara, v. 8, n. 2, p. 24-30, Feb. 1986.
- ARAÚJO, C. E. N. et al. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 86, n. 2, p. 87-96, Feb. 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1190. 1136 p.
- BABAPOUR, R.; GLASSBERG, E.; LASK, G. P. Low-energy laser systems. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 13, n. 1, p. 87-90, Jan./Feb. 1995.
- BAE, C. S. et al. Effect of Ga-As laser on the regeneration of injured sciatic nerves in the rat. **In Vivo**, Kapandriti, v. 18, n. 4, p. 489-495, July/Aug. 2004.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BARBOSA, R. I. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (660nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 294-299, out./dez. 2010.
- BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 31, n. 6, p. 674-686, June 2005.
- BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994. 253 p.

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

BHAGWANANI, N. S.; BHATIA, G. C.; SHARMA, N. Low level nitrogen laser therapy in pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 14, n. 1, p. 23-25, Feb. 1996.

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

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

BRAEKT, M. M. H. I. et al. Effect of low level laser therapy of wound healing after palatal surgery in Beagle dogs. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 11, n. 5, p. 462-470, Sept. 1991.

CANTI, G. et al. Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfurated phtalocyanines and laser light. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 443-447, Aug. 1994.

CHEN, W. R. et al. Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. **Cancer Research**, Baltimore, v. 62, n. 15, p. 4295-4299, Aug. 2002.

COHEN, B. J.; DANON, D.; ROTH, G. S. Wound repair in mice as influenced by age and antimacrophage serum. **Journal of Gerontology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 295-301, May 1987.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resoluções CFMV**. Disponível em:
<http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf>.
Acesso em: 5 abr. 2011.

CORRAL-BAQUÉS, M. I. et al. Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility. **Lasers in Medical Science**, New York, v. 20, n. 1, p. 28-34, Feb. 2005.

DALLAN, L. A. O.; OLIVEIRA, S. A. Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO₂. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 89-104, abr./jun. 2000.

DANON, D.; KOWATCH, M. A.; ROTH, G. S. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 6, p. 2018-2020, Mar. 1989.

DELAVARY, B. M. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 216, n. 7, p. 753-762, July 2011.

DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 35, n. 1, p. 84-89, July 2004.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 233-240, Oct. 1995.

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

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 127, n. 3, p. 514-525, Mar. 2007.

FERREIRA, E. et al. Morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 51-60, fev. 2003.

FUNG, D. T. C. et al. Effects of a therapeutic laser on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. **Lasers in Surgery Medicine**, New York, v. 32, n. 4, p. 286-293, Apr. 2003.

FUNK, J. O.; KRUSE, A.; KIRCHNER, H. He-Ne laser irradiation induces effects on cytokine production at the protein and mRNA level. **Experimental Dermatology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 75-83, Mar. 1993.

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

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

GHAMSARI, S. M. et al. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness wound in diary cattle. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 114-120, Mar./Apr. 1997.

_____. Evaluation of wound healing of the teat with and without low level laser therapy in diary cattle by laser Doppler flowmetry in comparison with histopathology, tensiometry and hydroxyproline analysis. **The British Veterinary Journal**, London, v. 152, n. 5, p. 583-592, Sept. 1996a.

_____. Histopatological effect of low laser therapy on sutured wounds of the teat in diary cattle. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 18, n. 1, p. 17-21, Mar. 1996b.

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

GOMEZ-VILLAMANDOS, R. J. et al. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 16, n. 2, p. 184-188, 1995.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews: Immunology**, London, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan. 2003.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, London, v. 453, n. 7193, p. 314-321, May 2008.

HILLENKAMP, F. Laser radiation tissue interaction. **Health Physics**, Hagerstown, v. 56, n. 5, p. 613-616, May 1989.

HOPKINS, J. T. et al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **Journal of Athletic Training**, Dallas, v. 39, n. 3, p. 223-229, July/Sept. 2004.

HU, W. P. et al. Helium-Neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 127, n. 8, p. 2048-2057, Aug. 2007.

IYOMASA, D. M. et al. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. **Micron**, New York, v. 40, n. 4, p. 413-418, June 2009.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

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

KANZLER, M. H.; GORSULOWSKY, D. C.; SWANSON, N. A. Basic Mechanisms in the healing cutaneous wound. **Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, New York, v. 12, n. 11, p. 1156-1164, Nov. 1986.

KARU, T. I. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **SPIE Proceedings**, Bellingham, v. 2630, p. 2-9, Jan. 1996.

KARU, T. I.; ANDREICHUCK, T.; RYABYKH, T. Suppression of human bllos chemi-luminescence by diode laser irradiation at wavelengths 660, 820, 880 or 950nm. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 5, n. 3, p. 103-110, 1993.

KIPSHIDZE, N. et al. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 28, n. 4, p. 355-364, 2001.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10. ed. São Paulo: Manole, 1998. 191 p.

KLEBANOV, G. I. et al. Low-power laser irradiation induces leukocyte priming. **General Physiology and Biophysics**, Bratislava, v. 17, n. 4, p. 365-376, Dec. 1998.

KREISLER, M. et al. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 353-358, Apr. 2003.

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

LEVINE, D. et al. **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. 95 p.

LINDHOLM, A. et al. Clinical effects of betamethasone and hyaluronan, and of defocalized carbon dioxide laser treatment on traumatic arthritis in the fetlock joints of horses. **Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, Berlin, v. 49, n. 4, p. 189-194, May 2002.

LUCAS, T. et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184, n. 7, p. 3964-3977, Apr. 2010.

LUZA, J.; HUBÁČEK, J. In vitro He-Ne laser effect on some immunological functions of the polymorphonuclears and monocytes in rabbits. **Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae**, Olomouc, v. 140, n. 1, p. 43-46, 1996.

MAENO, N. et al. Effects of laser therapy using helium-neon laser on infectious bovine keratoconjunctivitis. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 1, n. 2, p. 79-82, 1989.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, London, v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov. 2002.

MARCHIONNI, A. M. T. et al. Influence of laser ($\lambda 670\text{nm}$) and dexamethasone on the chronology of cutaneous repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 28, n. 5, p. 639-646, Oct. 2010.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, n. 11, p. 599-607, Nov. 2005.

MEDRADO, A. R. A. P. et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 32, n. 3, p. 239-244, Mar. 2003.

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

MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia veterinária**. São Paulo: Manole, 2006. 81 p.

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

MONACO, J. L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing: an overview. **Clinics in Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 1-12, Jan. 2003.

NOVOSELOVA, E. G. et al. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, London, v. 22, n. 1, p. 33-38, Feb. 2006.

PARDO, R. P. et al. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 258-262, jul./ago. 2006.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, New York, v. 187, n. 5A, p. 11S-16S, May 2004. Supplement.

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

PASTORE, D.; GRECO, M.; PASSARELLA, S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 76, n. 6, p. 863-870, June 2000.

PEREIRA, C. E. M. Contensor mecânico para ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 45-51, out./dez. 2001.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 24, n. 5, p. 616-624, Oct. 2006.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 142, n. 3, p. 481-489, Dec. 2005.

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

PROPHET, E. B. et al. **Afip laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 278 p.

PUGLIESE, L. S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, out./dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-74912003000400003&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 mar. 2012.

RAISER, A. G. et al. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 23-29, jan./mar. 2003.

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

RAVAZZANI, C. **Pantanal**. Curitiba: Brasil Natureza, 1990. 181 p.

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

_____. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, n. 5, p. 281-287, Sept. 1998.

REIS, S. R. A. et al. Effect of 670nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 26, n. 4, p. 307-313, Aug. 2008.

RIBEIRO, M. S. et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 22, n. 1, p. 59-66, Feb. 2004.

ROCHKIND, S. et al. Laser phototherapy (780nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 25, n. 5, p. 436-442, Oct. 2007.

_____. New method of treatment of severely injured sciatic nerve and spinal cord: an experimental study. **Acta Neurochirurgica Supplementum**, Wien, v. 43, p. 91-93, 1988.

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

SALET, C.; PASSARELLA, S.; QUAGLIARIELLO, E. Effects of selective irradiation on mammalian mitochondria. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 45, n. 3, p. 433-438, Mar. 1987.

SANCHEZ, P. J. M. et al. The effect of 670-nm low laser therapy on herpes simplex type 1. **Photomedicine and Laser Surgery**, New Rochelle, v. 30, n. 1, p. 37-40, Jan. 2012.

SARDARI, K. et al. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone. **Comparative Clinical Pathology**, New York, v. 20, n. 2, p. 155-162, 2011.

SCHMITT, I. et al. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 145-149, 1993.

SHAMIR, M. H. et al. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low power laser treatment. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, New York, v. 17, n. 2, p. 133-137, Feb. 2001.

SHIROTO, C. et al. Effects of diode laser radiation in vitro on activity of human neutrophils. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 1, n. 3, p. 135-140, 1989.

SILVA, A. E. et al. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 867-874, dez. 2004.

SILVA, J. P. et al. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 28, n. 1, p. 17-21, Feb. 2010.

SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 2009-2023, Aug. 1972.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, n. 10, p. 738-746, Sept. 1999.

SMITH, K. C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 3, n. 1, p. 19-24, 1991.

SOMMER, A. P. et al. Biostimulatory windows in low intensity laser activation: lasers, scanners and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 19, n. 1, p. 29-34, Feb. 2001.

STADELMANN, M. D.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American Journal of Surgery**, New York, v. 176, n. 2A, p. 26S-38S, Aug. 1998. Supplement.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Macrophages and angiogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 55, n. 3, p. 410-422, Mar. 1994.

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

TARDIVO, J. P. Effect of low power laser over cells infected by herpes simplex virus. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, n. 1, p. 888-893, 1989.

TORISEVA, M.; KÄHÄRI, V. M. Proteinases in cutaneous wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 2, p. 203-224, Jan. 2009.

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

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

WANDERER, C. et al. Use of lecitins to evaluate the effects of GaAs softlaser on dog tendon. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 27, n. 9, p. 2241-2251, Sept. 1994.

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

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 83, n. 3, p. 835-870, July 2003.

WHINFIELD, A. L.; AITKENHEAD, I. The light revival: does phototherapy promote wound healing?: a review. **The Foot**, New York, v. 19, n. 2, p. 117-124, June 2009.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, Sussex, v. 214, n. 2, p. 199-210, Jan. 2008.

YAMAMOTO, Y. et al. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 14, n. 3, p. 129-132, June 1996.

YOUNG, S. R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 2, n. 2, p. 53-57, Aug. 1990.

YOUNG, S. R. et al. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 9, n. 5, p. 497-505, 1989.

YU, H. S. et al. Low-energy helium–neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 107, n. 4, p. 593-596, Oct. 1996.

YU, W. et al. Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 21, n. 3, p. 262-268, June 1997.

ZHENG, H. et al. The activating action of low level helium neon laser radiation on macrophages in the mouse model. **Laser Therapy**, New Rochelle, v. 4, n. 1, p. 55-58, Feb. 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Foto da vista dorso-ventral da região da tricotomia e da localização da lesão feita com *punch* quatro mm

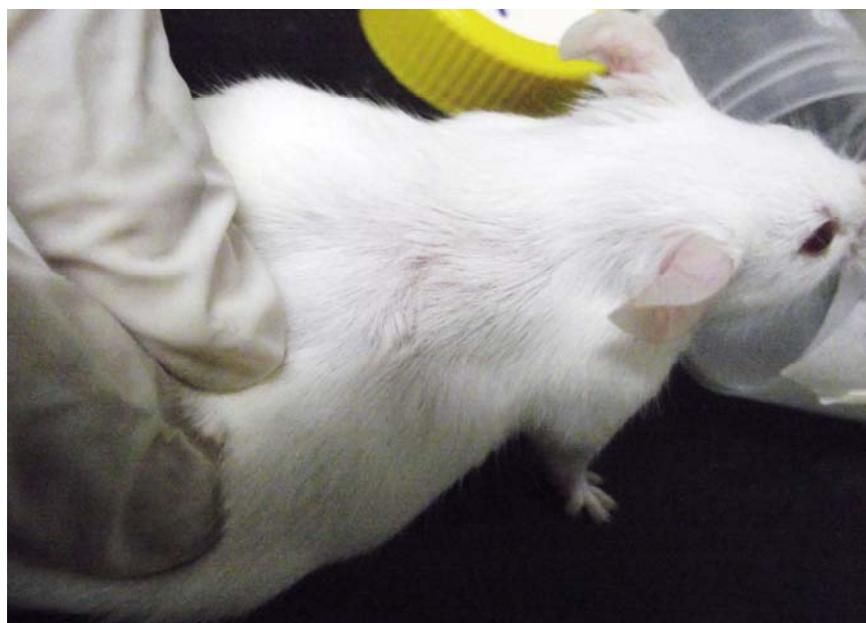


APÊNDICE B – Foto do contensor de camundongo para aplicação do laser

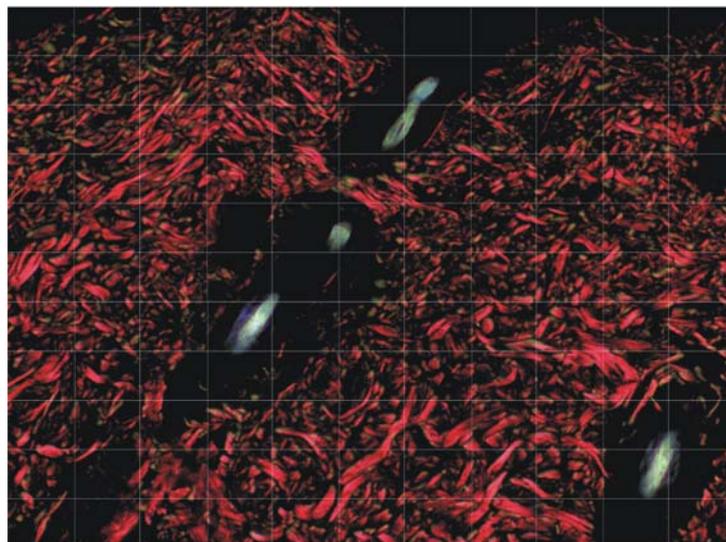
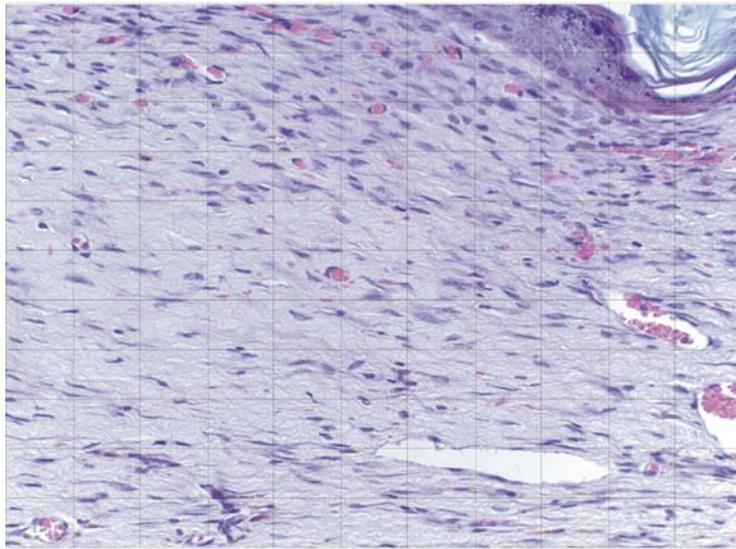
APÊNDICE C – Fotos demonstrando o posicionamento da probe do laser sobre a ferida



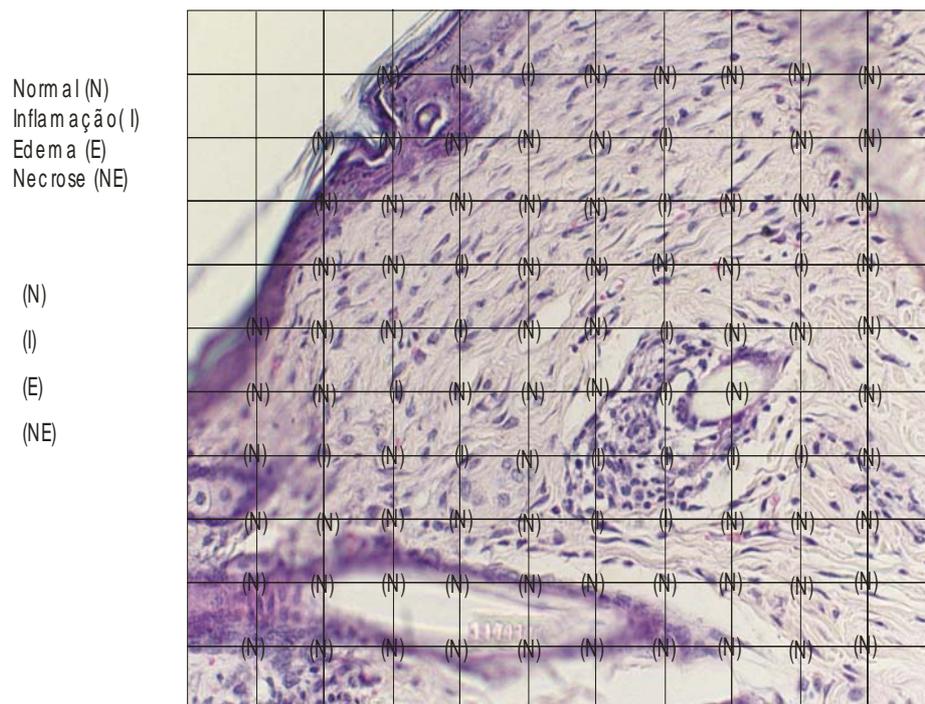
APÊNDICE D – Fotos demonstrando a aparência macroscópica das lesões ao 11º dia no grupo controle e laser, respectivamente



APÊNDICE E – Foto demonstrando a graticula de 100 pontos utilizada nas colorações por H.E. e *Picro-sirius red*



APÊNDICE F – Foto demonstrando o uso da gráticula de 100 pontos utilizada na coloração por H.E. Avaliam-se os pontos de intersecção da gráticula



ANEXOS

ANEXO A – Documento de aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 048/11**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação Histológica Associada a Identificação de Macrófagos no Processo de Reparo de Feridas Induzidas Experimentalmente em Camundongos Tratados Pela Laserterapia de Baixa Potência (λ904nm)**", que tem como responsável **Amanda Lemos Marques**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 27/10/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 048/11**, related to the project entitled "**Histological Assessment Associated Macrophage Identification Process in Wound Repair Experimentally Induced in Mice Treated by Low Level Laser Therapy (λ904nm)**", under the supervision of **Amanda Lemos Marques**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **October 27, 2011**.

Lavras, 27 de outubro de 2011.


 Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
 Presidente em exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
 Campus Universitário -
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 5182
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 048/11**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação Histológica Associada a Identificação de Macrófagos no Processo de Reparo de Feridas Induzidas Experimentalmente em Camundongos Tratados Pela Laserterapia de Baixa Potência (λ904nm)**", que tem como responsável **Amanda Lemos Marques**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 27/10/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 048/11**, related to the project entitled "**Histological Assessment Associated Macrophage Identification Process in Wound Repair Experimentally Induced in Mice Treated by Low Level Laser Therapy (λ904nm)**.", under the supervision of **Amanda Lemos Marques**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **October 27, 2011**.

Lavras, 27 de outubro de 2011.

Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente em exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

ANEXO B – Nota fiscal referente à compra dos animais do Biotério de Itaúna

| BIOTÉRIO ITAÚNA LTDA. | | NOTA FISCAL | | Nº 000086 | | | | | | |
|---|------------------------|--|--|---|---------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------|------------|--------------|
| RODOVIA MG 050, S/Nº - ITAÚNA A DIVINÓPOLIS VISTA ALEGRE - ZONA RURAL CEP 35680-000 - ITAÚNA - MINAS GERAIS | | CNPJ 10.406.901/0001-31 | | Inscrição Estadual 001.094946.0001 | | | | | | |
| NATUREZA DA OPERAÇÃO VENDA | | CFOP | | INSC. ESTADUAL DO SUBSTITUTO TRIBUTÁRIO | | | | | | |
| DESTINATÁRIO / REMETENTE NOME / RAZÃO SOCIAL AMANDA LOMAS MARQUES | | CNPJ / C/C 23.063.823-82 | | DATA LIMITE DE EMISSÃO: 60/90/00 | | | | | | |
| ENDEREÇO RHMV - UFA | | BARRIO / DISTRITO CAMPUS | | CEP 57200-000 | | | | | | |
| MUNICÍPIO LAURAS | | UF MG | | INSCRIÇÃO ESTADUAL | | | | | | |
| DATA DA EMISSÃO 28/03/2011 | | DATA SAÍDA / ENTRADA 28/03/2011 | | HORA DA SAÍDA | | | | | | |
| DADOS DO PRODUTO | | | | | | | | | | |
| CODIGO PRODUTO | DESCRIÇÃO DOS PRODUTOS | CL. FISC. | C.S.T. | UNID. | QUANTIDADE | VALOR UNITÁRIO | VALOR TOTAL | ALÍQUOTA (%) | | |
| | CAMUPO NEGOS | | | UN | 72 | 7,92 | 570,00 | | | |
| CÁLCULO DO IMPOSTO | | | | | | | | | | |
| BASE DE CÁLCULO DO I.C.M.S. | | VALOR DO I.C.M.S. | | BASE DE CÁLC. DO I.C.M.S. SUBSTITUIÇÃO | | VALOR DO I.C.M.S. SUBSTITUIÇÃO | | VALOR TOTAL DOS PRODUTOS | | |
| | | | | | | | | 570,00 | | |
| VALOR DO FRETE | | VALOR DO SEGURO | | OUTRAS DESPESAS ACESSÓRIAS | | VALOR TOTAL DO IPI | | VALOR TOTAL DA NOTA | | |
| | | | | | | | | 570,00 | | |
| TRANSPORTADOR (VOLUMES TRANSPORTADOS) | | | | | | | | | | |
| NOME / RAZÃO SOCIAL | | | FRETE POR CONTA 1 - EMISSOR 2 - DESTINATÁRIO | | PLACA DO VEÍCULO | | U.F. | | CNPJ / C/C | |
| ENDEREÇO | | | MUNICÍPIO | | U.F. | | INSCRIÇÃO ESTADUAL | | | |
| QUANTIDADE | | ESPÉCIE | | MARCA | | NÚMERO | | PESO BRUTO | | PESO LÍQUIDO |
| DADOS ADICIONAIS | | | | | | | | | | |
| INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES Documento emitido por ME ou EPP optante pelo Simples Nacional Não gera direito a crédito fiscal de ISS e IPI EMPRESA OPTANTE PELO SIMPLIFICADO NACIONAL. | | | | | RESERVAÇÃO AO FISCO | | | | | |
| CIA DO PAPEL Rua Párcelas Goiade, 118 - Centro - CEP: 35680-022 - Itaúna/MG - (37) 3241-0421, CNPJ: 05.855.387/0001-81 - Insc. Estadual: 338.251879.0066 GRAFICA O.P.S. LTDA 50 Notas Fiscais Modelo 1 em bloco de 50x5 de 000051 a 000100, Aut. nº00162725/2009 da AF/2ª Nível / Itaúna / SRF II em 03/12/2009. Impresso em 04/12/2009. | | | | | | | | | | |
| Recebi(emos) de BIOTÉRIO ITAÚNA LTDA., os produtos constantes desta Nota Fiscal indicada ao lado. | | | | | | NOTA FISCAL | | | | |
| DATA DO RECEBIMENTO | | IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR NOME LEGÍVEL: | | | | Nº 000086 | | | | |
| | | | | | | ASSINATURA | | | | |

ANEXO C – Documento de comprovação da calibração do Laser de Baixa Potência (BioSet®)

**ANEXO D – Protocolo para coloração por hematoxilina-eosina (HE) do
Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária (DMV)
da Universidade Federal de Lavras (UFLA)**

✓ **Desparafinização:**

| | |
|---------------|------------|
| Xilol I..... | 15 minutos |
| Xilol II..... | 15 minutos |

✓ **Hidratação:**

| | |
|--------------------|-----------|
| Álcool 100%..... | 2 minutos |
| Álcool 100%..... | 2 minutos |
| Álcool 100%..... | 2 minutos |
| Álcool 90%..... | mergulhar |
| Álcool 80%..... | mergulhar |
| Álcool 70%..... | mergulhar |
| Água corrente..... | 5 minutos |

✓ **Coloração:**

| | |
|--------------------|---------------|
| Hematoxilina..... | 2 minutos 30" |
| Água corrente..... | 5 minutos |
| Eosina..... | 1 minuto |
| Água corrente..... | lavar |

✓ **Desidratação:**

| | |
|------------------|-----------|
| Álcool 70%..... | mergulhar |
| Álcool 80%..... | mergulhar |
| Álcool 90%..... | mergulhar |
| Álcool 100%..... | mergulhar |
| Álcool 100%..... | mergulhar |
| Xilol I..... | 1 minuto |
| Xilol II..... | 1 minuto |

✓ **Montagem da lâmina**

Gota de Enthelan® e colar lamínula, retirando bolhas de ar.

ANEXO E – Protocolo para coloração por *picro-sirius red* do Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

✓ **Desparafinização:**

| | |
|---------------|-----------|
| Xilol I..... | 20minutos |
| Xilol II..... | 20minutos |

✓ **Hidratação:**

| | |
|--------------------|----------|
| Álcool 100%..... | 5minutos |
| Álcool 90%..... | 5minutos |
| Álcool 80%..... | 5minutos |
| Álcool 70%..... | 5minutos |
| Água corrente..... | 5minutos |

✓ **Coloração:**

| | |
|--|-------|
| Solução de <i>picro-sirius red</i> | 1hora |
|--|-------|

Obs.: Cobrir os cortes com a solução em suporte horizontal.

*** Solução de picro-sirius red:**

| | |
|--|-------|
| - Picro-sirius..... | 0,1g |
| - Solução de ácido pícrico saturada..... | 100mL |
| *Solução de ácido pícrico saturada: | |
| - Ácido pícrico..... | 1,3g |
| - Água destilada..... | 100mL |

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Escorrer e Gotejar HCL 0,01N..... | 3minutos |
|-----------------------------------|----------|

Obs.: Observar (pode demorar de 2 a 15 minutos).

*** Ácido clorídrico 0,01N:**

| | |
|-------------------------------------|-------|
| - Ácido clorídrico concentrado..... | 0,5mL |
| - Água destilada..... | 500mL |

Água corrente.....lavar rapidamente
Hematoxilina.....1minuto30”
Água corrente.....15minutos

✓ **Desidratação:**

Álcool 70%.....mergulhar
Álcool 80%.....mergulhar
Álcool 90%.....mergulhar
Álcool 100%.....3minutos

Obs.: Secar com ventilador.

Xilol I.....3minutos
Xilol II.....3minutos

✓ **Montagem da lâmina**

Gota de Enthelan® e colar lamínula, retirando bolhas de ar.

ANEXO F – Protocolo para coloração por Verhoeff do Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

➤ Material:

- Hematoxilina.....1g
- Álcool absoluto.....22mL
- Cloreto férrico solução 10% aquecida.....8mL
- Lugol.....8mL

➤ Aquecer o álcool.

➤ Preparar solução de lugol.

***Solução de lugol:**

- Iodo 2g.....0,5g
- Iodeto de potássio 4g.....1g
- H₂O 200mL.....50mL

➤ Cloreto férrico (40%.....10%).

***Cloreto férrico 100mL:**

- Percloroeto de ferro.....25mL
- H₂O destilada.....75mL

***Solução 10%FeCl₃:**

- 10g _____ 100mL H₂O
- 16,66g _____ 100mL H₂O

Obs.: 16,66g – se for hexahidratado (.6 H₂O)

➤ Hipossulfito de sódio 5% ou tiosulfato.

*** Solução 200mL:**

- Tiosulfito de sódio.....25g
- Dissolver em H₂O

➤ Dissolver a hematoxilina no álcool.

➤ Ao calor, filtrar e adicionar o cloreto férrico e depois o lugol.

- O corante deve ser usado após 24 horas e pode ser reutilizado.
- Indicado usar o sistema de coar em suporte horizontal.
- **Técnica:**

✓ **Desparafinização:**

| | |
|---------------|-----------|
| Xilol I..... | 30minutos |
| Xilol II..... | 30minutos |

✓ **Hidratação:**

| | |
|--------------------|-----------|
| Álcool 100%..... | 2minutos |
| Álcool 100%..... | 2minutos |
| Álcool 90%..... | mergulhar |
| Álcool 80%..... | mergulhar |
| Álcool 70%..... | mergulhar |
| Água corrente..... | 5minutos |

✓ **Coloração:**

Hematoxilina de Verhoeff.....15minutos

Obs.: Não precisa filtrar. Colocar o corante sobre os cortes em suporte horizontal.

Obs.: Os cortes devem ficar pretos. Caso não ficar, recolocar o corante por mais 15 minutos.

Água corrente.....5minutos

Descorar na solução de cloreto férrico 2%.....alguns segundos

Obs.: Fazer em cuba (borrel).

Obs.: Acompanhar em microscopia óptica: os cortes devem estar limpos, mas as fibras elásticas à mostra (tingidas de preto). Cuidar para não descorar muito.

Água corrente.....lavar

Álcool 95%.....mergulhar

Tratar pela solução de hipossulfito de sódio 5%.....5minutos

Água corrente.....5minutos

Contra-corar com eosina.....15segundos

Obs.: Pode substituir eosina por verde-luz (30segundos).

✓ **Desidratação:**

| | |
|------------------|-----------|
| Álcool 70%..... | mergulhar |
| Álcool 80%..... | mergulhar |
| Álcool 90%..... | mergulhar |
| Álcool 100%..... | mergulhar |
| Álcool 100%..... | mergulhar |
| Xilol I..... | 1 minuto |
| Xilol II..... | 1 minuto |

✓ **Montagem da lâmina**

Gota de Enthelan® e colar lamínula, retirando bolhas de ar.

**ANEXO G – Protocolo para coloração por imunistoquímica do
Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências
Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**

OBS: Sempre retirar da geladeira minutos antes o reagente para que este fique à temperatura ambiente e não promova choque térmico nos cortes.

1. Ao chegar ao laboratório, fechar as janelas, ligar o ar condicionado e o banho-maria.
2. Colocar as lâminas em Xilol I por 15 minutos (desparafinar e hidratar).
3. Enquanto isso, fazer o PBS e a solução retrieval, ambos a 10%, e medir o pH.
Adicionar 200 μ L de Tween 20 – Dako (sabão 0,05%) para cada 1L de PBS.
* O pH do PBS deve ser de 7,0 a 7,5.
4. Colocar as lâminas em Xilol II por 15 minutos.
5. Colocar as lâminas em ABS I por cinco minutos.
6. Colocar as lâminas em ABS II por cinco minutos.
7. Colocar as lâminas em Álcool 90GL por cinco minutos.
8. Colocar as lâminas em Álcool 80GL por cinco minutos.
9. Lavar as lâminas em água corrente por cinco minutos. Colocá-las no cantinho do recipiente e abrir pouco a torneira para não danificar os cortes.
10. Para o uso da Pepsina, colocar o cuvete na estufa a 37°C por 30 minutos, ao invés do banho-maria.
11. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.
12. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.

13. Colocar as lâminas no bloqueio da Peroxidase por 15 minutos.
 - 5mL de peróxido de hidrogênio + 45mL de álcool metílico (10% de H₂O₂ em solução de CH₃OH)
 14. Colocar as lâminas em PBS por três minutos.
 15. Colocar as lâminas em PBS por três minutos.
 16. Colocar as lâminas em PBS por três minutos.
 17. Colocar as lâminas em PBS por três minutos.
 18. Enxugar delicadamente as lâminas com papel higiênico e contornar os cortes com a caneta PAP PEN.
 19. Colocar as lâminas na câmara úmida e cobrir os cortes com gotas de soro normal*. Em seguida, tampar a câmara e deixar por 10 minutos.
(Large volume ultra V Block – Ref.: TA 015 VB – Lot.: AUB 60719 – Lab Vision – frasco branco).
 20. Enquanto isso, fazer a diluição do anticorpo.
 - * (Diluyente: Large volume ultraAb Diluent – Cat.: TA 125 UD – Lot.: AUD 30929 – Lab Vision)
 - Diluição: 1:50.
 - Após a diluição do anticorpo, deve-se agitá-lo no *Vortex* por 5-10 segundos para melhor homogeneização do diluyente com o anticorpo.
- OBS: Não retornar o anticorpo primário diluído para a geladeira. Este deve permanecer em temperatura ambiente para não haver choque térmico ao ser colocado sobre os cortes histológicos.
21. Escorrer o soro e enxugar as lâminas delicadamente com papel higiênico.
 22. Pipetar o anticorpo primário e incubar as lâminas na câmara úmida por uma hora.
 23. Retirar o anticorpo primário e lavar as lâminas com PBS por três minutos.
 24. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.

25. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.
26. Colocar 50µL de potencializador do anticorpo primário e incubar na câmara úmida por 20 minutos, à temperatura ambiente.
27. Colocar as lâminas na câmara úmida e cobrir os cortes com gotas do polímero*. Tampar a câmara úmida e deixar por 30 minutos.
*(Ultravision One HRP Polymer – Ref.: TL 015 PHJ – Lot.: PHJ 60929 – frasco amarelo)
28. Retirar o soro e colocar as lâminas em PBS por três minutos.
29. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.
30. Colocar as lâminas em PBS por cinco minutos.
31. Enquanto isso, fazer a diluição do DAB (usar luvas).
 - 40µL de DAB Plus Chromogen (1 gota) + 2mL de DAB Plus Substrate
32. Dentro da capela de fluxo laminar, cobrir as lâminas com DAB utilizando uma micropipeta. Tampar a câmara úmida e deixar por 10 minutos.

Enquanto isso, filtrar a hematoxilina.
33. Descartar o DAB no local apropriado.
34. Lavar as lâminas em água corrente por cinco minutos.
35. Colocar as lâminas em hematoxilina por três segundos.
36. Lavar as lâminas em água corrente por 10 minutos.
37. Colocar as lâminas em Álcool 80GL por três minutos.
38. Colocar as lâminas em Álcool 90GL por três minutos.
39. Colocar as lâminas em ABS II por 10 minutos.
40. Colocar as lâminas em ABS I por 10 minutos.

41. Colocar as lâminas em Xilol I por dois minutos.
42. Colocar as lâminas em Xilol II por dois minutos.
43. Montar a lâmina: colocar uma gota de bálsamo do Canadá sobre o corte, sobrepor com a lamínula e retirar possíveis bolhas de ar.