

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
Curso de Pós-Graduação em Patologia**



FIOCRUZ

UFBA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PARTICIPAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA**

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Salvador - Bahia

2001



001755

PARTICIPAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO - INFLUÊNCIA DO
RAIO LASER DE BAIXA POTÊNCIA.

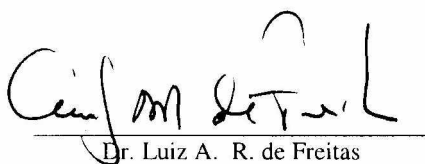
ALENA RIBEIRO ALVES PEIXOTO MEDRADO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cristina Takyia
Professora Adjunto
UFRJ



Dr. Luiz A. R. de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Zilton Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

SUPLENTE



Dra. Silvia Reis
Professora Adjunto
FAMED - UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
Curso de Pós-graduação em Patologia

PARTICIPAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

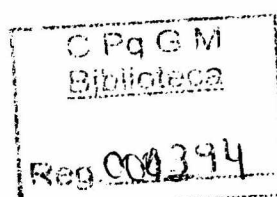
Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Professor orientador: Dr. Zilton de Araújo Andrade

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental

Salvador - Bahia

2001



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ – Salvador - Bahia

Medrado, Alena Ribeiro Alves Peixoto
M492p Participação de miofibroblastos no processo de cicatrização –
Influência do raio laser de baixa potência / Alena Ribeiro Alves
Peixoto Medrado. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia /
CPqGM / FIOCRUZ, 2001.
119 p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade
Federal da Bahia, 2001.

1. Miofibroblastos. 2. Cicatrização de feridas. 3. Lasers. I. Título.

CDU:616-092: 616-003.9

**“Porque melhor é a sabedoria do que os corais, e mesmo todos os outros
agrados não se podem igualar a ela....”**

(Provérbios 8:11)

**Ao meu querido Deus, Jeová, pelo amparo nas horas mais difíceis
Aos meus pais, eternos companheiros, pelo apoio e confiança
A Nilton, pelo amor e incentivo
A Laurinha, minha fonte de verdadeira inspiração**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Zilton de Araújo Andrade, meu dileto orientador, cuja constância e determinação incansáveis incutiram-me um espírito perseverante, exemplo de honestidade e longanimidade, bem como de seriedade na arte de fazer ciência.

À Dr^a. Sônia Gumes Andrade, pelo apoio demonstrado em todas as ocasiões, e pela concessão dos equipamentos necessários para a realização de algumas etapas deste estudo.

À Dr^a. Sílvia Regina de Almeida Reis, professora companheira e incentivadora, cujas ações sempre falaram mais alto do que as palavras, e que esteve presente em cada momento profissional da minha carreira.

Ao Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, chefe do laboratório de patologia e biologia celular - LPBC, pela disponibilização do espaço físico do laboratório para a realização da técnica de imunohistoquímica.

À Dr^a. Tânia Correia, pela prestimosa e valiosa orientação na técnica de imunohistoquímica, reacendendo em mim o prazer que se pode usufruir quando se dedica a um objetivo com afinco e esmero.

À Dr^a. Rosane de Fátima Lizarelli, que esteve sempre presente apesar da distância que nos separava, pelos conselhos valiosos e atenção dispensada, no tocante a utilização do laser de baixa densidade de potência.

Ao Dr. Urbino da Rocha Tunes, diretor da Faculdade Bahiana de Odontologia, que despertou em mim o interesse pela docência, e pela pesquisa.

À minha grande amiga, Ana Cristina Gonzalez, que embora estivesse vivenciando neste curto período as mais lindas e profundas emoções ao gerar

duas vidas, sempre reservou um momento para me ensinar e compartilhar seus conhecimentos e experiências, incentivando-me a prosseguir.

A Cláudio Figueira, um exemplo de prestimosidade e abnegação, cuja ajuda foi decisiva para a qualidade técnica das fotomicrografias obtidas com a microscopia eletrônica de transmissão.

À minha ex-aluna e companheira de todas as horas, Lívia Pugliese, que sempre acreditou no sucesso deste trabalho e que nos forneceu uma valiosa colaboração na organização das técnicas e no manuseio com os animais.

À amiga Sheilla de Oliveira Siqueira, colega de mestrado, presente nas horas críticas, dando sempre uma palavra de conforto e coragem, e que, apesar de estar enfrentando desafios aparentemente intransponíveis, nunca perdeu o bom-humor e alegria que lhes são inerentes.

Às amigas e companheiras, Márcia Souza, Luciana Silva e Cláudia Borges, pela paciência nas horas mais difíceis e pelos conselhos pertinentes e oportunos.

Ao Sr. Antônio Carlos, técnico do Lapex, pela alegria, empatia e espírito prestativo em todas as ocasiões.

À colega do setor de áudio visual Tânia de Faria, pela disponibilidade em todos os momentos necessários.

Às bibliotecárias Adelvani Araújo Boa-Morte e Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pela preciosa e minuciosa revisão deste trabalho, incluindo as referências bibliográficas.

À Sr^a. Edite Silva Santos, pelas palavras de incentivo e paciência demonstrada na utilização da fotocopadora.

À Sr^a. Rosália Meires Silva, pelo constante incentivo e sábias e experientes palavras de apoio.

Às técnicas do laboratório de Histopatologia, Cristina dos Santos Vasconcelos Mota, Creuza Vasconcelos Mota e Maria Amélia Maurício Sodré, pela prestimosidade demonstrada para a realização das técnicas histológicas necessárias a este estudo.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, pela concessão da bolsa de estudos, a qual viabilizou uma dedicação integral para a execução do trabalho.

A todos os companheiros do LAPEX e do laboratório de CHAGAS, que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste estudo, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

	RESUMO	X
	ABSTRACT	XI
1	INTRODUÇÃO	01
2	REVISTA DA LITERATURA	03
2.1	MIOFIBROBLASTOS	03
2.1.1	Histórico	03
2.1.2	A biologia celular dos miofibroblastos	04
2.1.3	Participação de miofibroblastos na cicatrização	06
2.1.4	Alteração fenotípica induzida por citocinas	08
2.1.5	Presença de miofibroblastos em outras condições patológicas	10
2.2	REPARO	11
2.2.1	Generalidades	11
2.2.2	O papel das citocinas no reparo	15
2.2.3	Fatores que interferem no reparo	16
2.3	LASER	18
2.3.1	Generalidades	18
2.3.2	Alterações bioquímicas, celulares e moleculares induzidas pela Laserterapia	21
2.3.3	Laserterapia na cicatrização	24
3	OBJETIVOS	28
4	JUSTIFICATIVA	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS E SACRIFÍCIOS	30
5.3	APLICAÇÃO DO LASER	32
5.4	MICROSCOPIA ÓPTICA	34
5.4.1	Colorações de rotina	34
5.4.2	Imunohistoquímica	35
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	38
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6	RESULTADOS	40
6.1	MACROSCOPIA	40
6.2	MICROSCOPIA ÓPTICA	41
6.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA	49
7	DISCUSSÃO	53
8	CONCLUSÃO	69
9	PRANCHAS	71
10	GRÁFICOS	100

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO – INFLUÊNCIA DO RAIOS LASER DE BAIXA POTÊNCIA.

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado. [Introdução] O reparo tecidual que se processa durante a cicatrização de ferimentos cutâneos se faz às custas de intensa proliferação celular, deposição de novos elementos da matriz extracelular, bem como seu posterior remodelamento. Nesta fase da cicatrização, entre muitos outros elementos celulares, destacam-se os miofibroblastos. Diversas variáveis podem interferir no curso da cicatrização tecidual, incluindo fatores endógenos e exógenos. Um dos fatores exógenos recentemente estudado é a terapia com laser de baixa potência. Contudo, a eficácia desta fototerapia tem suscitado opiniões contraditórias, e numa tentativa de contribuir para o seu entendimento, ela foi particularmente considerada. [Material e Métodos] Realizaram-se ferimentos cutâneos padronizados no dorso de 72 ratos Wistar, e em seguida, aplicação pontual do raio laser de baixa potência do tipo Ga-As-Al com diferentes densidades de energia. Os animais foram sacrificados com 24, 48 e 72 horas, bem como, 5, 7 e 14 dias. Procedeu-se a análise das secções teciduais coradas por hematoxilina-eosina, sítius vermelho e orceína. Para a realização do estudo dos miofibroblastos, os anticorpos anti-vimentina, anti-actina-alfa de músculo liso e anti-desmina foram usados pela técnica de imunohistoquímica. As características ultraestruturais destas células foram estudadas através da microscopia eletrônica de transmissão. [Resultados] Observou-se que nos grupos submetidos à laserterapia, houve maior redução de edema e infiltrado inflamatório, assim como desgranulação de mastócitos. Com a evolução da cicatrização, os níveis de colágeno demonstraram-se mais pronunciados nos grupos tratados com laser. Com relação às fibras elásticas, não se constatou diferenças entre os grupos. A marcação imunohistoquímica de miofibroblastos expressando o fenótipo desmina/actina alfa de músculo liso foi mais evidente nos 3^o, 5^o e 7^o dias do período pós-operatório, e foi superior nos grupos tratados. Os achados ultraestruturais revelaram a presença de células com filamentos intracitoplasmáticos, corpos densos abaixo da membrana plasmática, rico retículo endoplasmático rugoso e núcleo chanfrado. O grupo tratado com 4 J/cm² de densidade de energia apresentou resultados mais favoráveis, comparativamente ao de 8 J/cm². [Conclusão] O laser contribuiu para a redução do edema pós-operatório, e proporcionou um aumento do colágeno, em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, induziu uma maior expressão de miofibroblastos no leito do ferimento. [Palavras-chave] Miofibroblastos; cicatrização de feridas; lasers.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF MYOFIBROBLASTS ON WOUND HEALING PROCESS – INFLUENCE OF LOW LEVEL LASER THERAPY. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado. [Introduction] The tissue repair that takes place during wound healing depends upon intensive cellular proliferation, deposition of new elements of the extracellular matrix, and its posterior remodeling. In this phase of healing, among many cellular components, myofibroblasts become more evident. Many variables might interfere on the course of wound healing, including endogenous and exogenous factors. One of the exogenous factors recently studied is the low level laser therapy. Moreover, the efficacy of this phototherapy has given place to contradictory statements. Present investigation re-evaluates the role of laser therapy in wound healing. [Methods and Materials] Cutaneous wounds were performed on the back of 72 Wistar rats, and after this, a low level laser of the type Ga-As-Al was punctually applied with different energy densities. The animals were sacrificed with 24, 48 e 72 hours and, 5, 7 and 14 days. Lesions were analyzed by means of hematoxylin-eosin, sirius red fast green and orcein stained slides. The study of myofibroblasts was performed by immunohistochemistry, with anti-vimentin, anti- smooth muscle alpha-actin and anti-desmin antibodies. The ultrastructural features of myofibroblasts were studied by transmission electron microscopy. [Results] It was observed that the laser group showed great reduction of edema and inflammatory infiltrate, and degranulation of mast cells. Along the evolution of the wound healing, the collagen levels were more pronounced in the groups which received laser therapy. In relation to elastic fibres, there were no differences between the groups. The immunohistochemical label of myofibroblast expressing a desmin/ smooth muscle alpha actin phenotype was more prominent on the 3rd, 5th and 7th days after surgery, and was superior on the treated groups. The ultrastructural findings revealed the presence of cells with intracytoplasmatic myofilaments, dense sub-membranar bodies, rich rough endoplasmatic reticulum and an indented nucleus. The group treated with 4 J/cm² of density energy presented more prominent results, when compared with the 8 J/cm² group. [Conclusion] Laser therapy contributed to the reduction of post operative edema, and provided an increase of the collagen, when compared to the control group. Additionally, it induced a larger expression of myofibroblasts within the wound. [Key-words] Myofibroblasts; wound healing; laser.

1 INTRODUÇÃO

O uso da luz com finalidades terapêuticas, abrangendo os seus diferentes espectros, vem sendo defendido há séculos (MISERANDINO & PICK, 1995). Atualmente, grande ênfase tem sido dirigida ao emprego da irradiação laser de baixa densidade de potência, no intuito de promover uma cicatrização mais rápida e favorável, acentuando as respostas bioquímicas celulares e desta forma, contribuindo para uma resolução significativamente mais eficaz do ferimento. Do ponto de vista tecnológico, diversos tipos de aparelhos emissores da luz laser vêm sendo desenvolvidos e testados, tanto experimentalmente, como na rotina clínica de inúmeras áreas de saúde, principalmente na medicina, fisioterapia e odontologia. A esfera de atuação do laser é muito ampla e tem-se investigado sobre a sua contribuição no processo de reparo, particularmente no que diz respeito à sua influência na modulação de alguns tipos celulares que integram o microambiente da cicatrização. Entre estes, os miofibroblastos exercem um papel decisivo, embora pouco se saiba sobre a interferência do laser na diferenciação fenotípica desta célula. Estas células são efetivamente responsáveis pela contração do ferimento, expressando transitoriamente um fenótipo de músculo liso.

No presente estudo experimental, decidiu-se investigar a participação deste importante elemento celular, durante o reparo tecidual, sob a ação do laser de baixa densidade de potência, optando-se pela adoção da pele, como o tecido de eleição para a execução de ferimentos padronizados, os quais viabilizaram uma análise mais acurada do processo cicatricial.

Considerando-se o miofibroblasto como o alicerce deste estudo descritivo, procedeu-se o exame histológico e ultraestrutural dos principais elementos constituintes do reparo, sob à influência da irradiação da luz laser.

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 MIOFIBROBLASTO

2.1.1. Histórico

O miofibroblasto foi descoberto em eletromicrografias de tecido de granulação presente em processos de cicatrização induzidos experimentalmente (GABBIANI et al., 1971). Logo depois, suas características bioquímicas e seu perfil imunohistoquímico passaram a ser amplamente estudados. A partir destas descobertas, a lista de condições patológicas nas quais estas células têm sido identificadas, tem crescido consideravelmente.

Em 1916, CARREL & HARTMAN observaram a presença de forças contráteis em cicatrização de ferimentos. Durante muitos anos, pensou-se que o colágeno era o elemento essencial para esta contração. Todavia, esta hipótese foi questionada através da realização de um estudo experimental realizado na década de 50, no qual foram utilizados porcos da Índia acometidos por escorbuto (ABERCROMBIE et al., 1956). Neste experimento, observou-se que a contração da ferida era normal nestes animais, e estes achados colocaram em dúvida a contratilidade do colágeno e sugeriram que esta característica seria desempenhada essencialmente por células.

De acordo com SCHÜRCH et al. (1997), nos primórdios da década de 70, muitos pesquisadores ficaram surpresos com a morfologia ultra-estrutural de

fibroblastos presentes na parede do bolsão inflamatório de Selye. Eles pareciam muito diferentes dos fibroblastos observados na derme de ratos normais. Os seus citoplasmas estavam preenchidos por abundantes microfilamentos, um aspecto típico de células musculares lisas. Muitos pesquisadores decidiram investigar a similaridade existente entre estes fibroblastos presentes em tecidos de granulação e células musculares lisas. Eles hipotetizavam se tais células seriam responsáveis ou não, pelo mecanismo contrátil observado no tecido de granulação durante o fechamento da ferida, e através de uma série de modelos experimentais, definiram as características ultraestruturais destes fibroblastos modificados e sugeriram que estas células poderiam ser as responsáveis pela contração do ferimento (GABBIANI et al., 1972).

Nos anos seguintes, foram realizados detalhados estudos a respeito dos filamentos intermediários e isoformas de actina presentes em miofibroblastos sob diversas circunstâncias (SERINI et al., 1999).

Na década atual, há quase 30 anos após a descoberta inicial, tem sido demonstrado que o miofibroblasto é reconhecidamente um elemento central nos diversos tecidos, e que tem participação ativa em diversos processos patológicos.

2.1.2.- A biologia celular dos miofibroblastos

Desde a primeira descrição dos miofibroblastos na década de 70, várias origens foram propostas para estas células. Tendo em vista que a matriz extracelular pode influenciar na diferenciação das células do tecido conjuntivo,

vários tipos celulares deste tecido poderiam se diferenciar em miofibroblastos, tais como, fibroblastos, células musculares lisas, pericitos e quaisquer outras células mesenquimais indiferenciadas (MASUR et al., 1996; SAPPINO et al., 1990).

A heterogeneidade da composição do citoesqueleto dos miofibroblastos levanta muitos questionamentos em relação à origem destas células. De acordo com SCHÜRCH et al. (1987), os dados ultraestruturais fornecem evidências de que em meios de cultura, e durante condições patológicas, os fibroblastos e as células musculares lisas vasculares adquirem aspectos morfológicos muito semelhantes aos dos miofibroblastos, o que sugere que estes dois tipos celulares possam ser progenitores dos mesmos. Os filamentos intermediários de actina alfa e desmina poderiam ser oriundos de células musculares lisas ou pericitos, uma vez que estas células apresentam uma disposição citoesquelética similar. Uma possível origem vascular também foi proposta por SHUM et al. (1988) com base em observações morfológicas, as quais indicaram a possibilidade de que as células miofibroblásticas desmina positivas, migram da parede de vasos sanguíneos para o tecido.

Segundo GABBINI et al. (1972), os miofibroblastos presentes em tecido de granulação eram provavelmente originários de fibroblastos pré-existentes. Em tecidos de granulação estudados experimentalmente, os miofibroblastos expressavam temporariamente marcadores de diferenciação de células musculares lisas, como por exemplo a actina alfa de músculo liso, que desapareciam depois do fechamento da ferida. Contudo, o destino dos miofibroblastos ainda não é bem definido (LIPPER et al., 1980). Somente

fibroblastos típicos são vistos nos estágios finais dos processos fibrocontráteis, o que sugere que o miofibroblasto pode alterar o seu citoesqueleto e retornar à condição de fibroblasto ou desencadear o processo de apoptose (DESMOULIÈRE et al., 1995).

No que diz respeito ao perfil ultraestrutural do miofibroblasto, sabe-se que esta célula compartilha aspectos morfológicos comuns aos fibroblastos e células musculares lisas (DARBY et al., 1990). Estes elementos celulares exibem um contorno irregular com numerosas e longas extensões citoplasmáticas, e podem estar conectados por junções de aderência e, comunicantes. Eles são envolvidos por uma lâmina basal, possuem várias vesículas pinocíticas e apresentam-se conectados à matriz extracelular por intermédio de fibronexus. Os fibronexus são complexos transmembranares de microfilamentos intracelulares em aparente continuidade com as fibras extracelulares de fibronectina. Estas estruturas são muito expressivas numericamente nos miofibroblastos quando comparados às células musculares lisas. O retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi apresentam-se bem desenvolvidos, ao passo que o núcleo demonstra profundas invaginações (SCHÜRCH et al., 1997).

2.1.3.- Participação de miofibroblastos na cicatrização

Para que se possa compreender a maneira pela qual os miofibroblastos participam do processo de cicatrização, urge a realização de um breve retrospecto dos principais fenômenos relacionados com o processo cicatricial. A cicatrização é um evento biológico complexo, o qual envolve inflamação,

proliferação celular e diferenciação. Está cada vez mais evidente que a migração, polaridade e reorientação das células envolvidas neste processo, podem ser influenciadas pelos constituintes da matriz extracelular, como por exemplo, a fibronectina (YAMADA, 2000).

Uma das etapas críticas da cicatrização é a formação do tecido de granulação. Este tecido consiste em muitas camadas de células fibroblásticas, separadas por uma matriz colagênica contendo brotamento de capilares e células inflamatórias. Os fibroblastos presentes no tecido de granulação, geralmente exibem aspectos ultraestruturais de miofibroblastos. Eles são bem numerosos e mais desenvolvidos na camada exsudativa do ferimento e vão sendo gradativamente substituídos por fibroblastos a partir das camadas mais profundas. Em modelos experimentais, como o proposto por EDDY et al. (1988), a análise das proteínas do citoesqueleto por métodos de imunocitoquímica revela que os miofibroblastos presentes no processo normal de cicatrização não expressam miosina de músculo liso durante o fechamento da ferida. A diferenciação em células semelhantes às musculares lisas está ausente no tecido de granulação inicial. Nesta fase, os miofibroblastos são pouco desenvolvidos, podendo expressar filamentos de vimentina no seu citoesqueleto (GABBIANI, 1994). Todavia, esta diferenciação fenotípica se torna temporariamente aparente, quando os miofibroblastos começam a expressar actina alfa de músculo liso em quantidades cada vez maiores por volta do 8^o ao 15^o dia durante a cicatrização. Esta isoforma da actina desaparece progressivamente dos miofibroblastos e deixa de ser detectada por volta do 30^o dia (SCHÜRCH et al., 1997).

2.1.4.– Alteração fenotípica induzida por citocinas

Um aspecto importante no estudo de miofibroblastos tem sido investigado, a saber, a ocorrência de fatores que influenciam o desenvolvimento e o desaparecimento destas células durante o processo de cicatrização (GABBIANI, 1996). Através da secreção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios de natureza lipídica e gasosa, os miofibroblastos desempenham um importante papel na organogênese, inflamação, reparo e fibrose da maioria dos órgãos e tecidos (POWELL et al., 1999). RUBBIA-BRANDT et al. (1991), desenvolveram um estudo a fim de caracterizar o papel das citocinas e possíveis fatores de crescimento envolvidos na diferenciação de miofibroblastos, utilizando mini-bombas osmóticas implantadas subcutaneamente no dorso de ratos, as quais liberavam uma grande variedade destes mediadores químicos. Os autores constataram que cada citocina, em particular, apresentava propriedades específicas e podia estimular diferentes grupos celulares. Adicionalmente, demonstraram que TNF, IL-1 e PDGF não estimulavam a formação do miofibroblasto, mesmo quando estas citocinas estavam presentes na resposta tecidual granulomatosa, ao passo que TGF- β 1 e 2, e mais surpreendente ainda, o GM-CSF, estimulavam regularmente o aparecimento de miofibroblastos ricos em actina alfa de músculo liso. Considerando que a atividade pro-fibrótica do TGF- β tem sido amplamente descrita (SERINI et al., 1999) e particularmente estimula a síntese de colágeno tipo I, alguns autores concluíram que esta citocina é provavelmente muito importante no desenvolvimento da cicatrização e fibrose (RONNOV-JESSEN et al., 1993). YOKOZEKI et al. (1999) salientaram que, ao passo que o TGF- β 1

estimulava a mudança fenotípica dos miofibroblastos, o IFN- γ alterava significativamente o citoesqueleto destas células, através do declínio na expressão de actina alfa de músculo liso. Tal fato, implicava na diminuição da contratilidade dos miofibroblastos. Com base nestas observações, os autores sugeriram que o IFN- γ pode regular negativamente a ação do TGF- β no controle das alterações no fenótipo de miofibroblastos.

PETROL et al. (1998), estudando o endotélio da córnea de gatos, observaram que sob certas condições patofisiológicas, as células endoteliais podem produzir colágeno anormalmente, em virtude da ação estimulatória do TGF- β . Eles concluíram que as células endoteliais em proliferação adquirem um fenótipo temporário de miofibroblastos.

O IFN- γ é uma citocina multifuncional que tem sido utilizada como um agente terapêutico em potencial para o tratamento de vários processos fibrogênicos, incluindo as cicatrizes anormais. A observação de que o IFN- γ diminui a expressão de actina alfa de músculo liso em células musculares lisas, sugere que um fenômeno semelhante possa acontecer em tecidos de granulação e tecidos com fibrose. DESMOULIÈRE et al. (1992) demonstraram *in vivo* que o IFN- γ diminuiu a expressão de actina alfa em fibroblastos em meio de cultura. Além desses estudos, outros estudos pilotos clínicos tem sugerido que a aplicação do IFN- γ é eficiente na redução de cicatrizes hipertróficas e lesões fibromatosas (PITTET et al., 1993).

Logo, o desenvolvimento dos miofibroblastos provavelmente depende não só do estímulo fornecido pela organização da matriz extracelular, mas também do efeito estimulatório gerado por estas citocinas descritas.

2.1.5- Presença de miofibroblastos em outras condições patológicas

Além das fibromatoses, muitas outras condições proliferativas que freqüentemente mimetizam sarcomas, compartilham a sua composição predominantemente miofibroblástica e demonstram um potencial proliferativo variável, embora não se disseminem. Entre as condições proliferativas mais citadas, destaca-se a fibromatose do tipo “Dupuytren”, na qual os pacientes freqüentemente apresentam múltiplos nódulos, os quais exibem uma considerável variação nos seus padrões histológicos (PITTET et al., 1993). De acordo com MATTE et al (1990), uma composição heterogênea do citoesqueleto também é observada em miofibroblastos presentes em dermatofibromas, os quais apresentam pelo menos três fenótipos diferentes: vimentina/ actina, vimentina/ actina/ desmina e somente vimentina.

Muitos carcinomas invasivos e metastáticos são caracterizados por uma consistência endurecida e retração. Ao que tudo indica, os miofibroblastos são particularmente numerosos dentro do estroma dessas neoplasias, e os fenômenos de retração observados são atribuídos às forças contráteis geradas pelos miofibroblastos presentes no estroma (SCHÜRCH et al., 1981). Os miofibroblastos também foram descritos na doença de Hodgkin esclerosante nodular (SEEMAEYER et al., 1980), a qual apresenta uma reação estromal nodular que é altamente colagenizada. Estas áreas contém numerosas células

que exibem o fenótipo vimentina/ actina ou apenas vimentina, e poucos miofibroblastos com o fenótipo vimentina/ actina/ desmina.

Alguns autores descreveram os chamados tumores miofibroblásticos. GHADIALLY et al. (1983) analisaram histologicamente um miofibroblastoma. Na descrição do caso clínico, os autores verificaram, à luz da microscopia eletrônica, que o neoplasma era composto quase que exclusivamente por miofibroblastos e alguns macrófagos ocasionais. Não foi observada a presença de fibroblastos nesta lesão. Em estudos de leiomiossarcomas, SCHURCH et al. (1987) constataram que estes neoplasmas são bastante heterogêneos, e que a utilização de marcadores para as proteínas de citoesqueleto, tais como desmina e actina alfa, é útil para identificar os tipos celulares presentes no estroma dos tumores, incluindo miofibroblastos.

Segundo ANDRADE et al. (1999), a lesão hepática característica observada em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, representada pela fibrose portal, contém miofibroblastos, oriundos da dispersão das fibras musculares lisas que se segue à agressão da veia porta. Os achados ultraestruturais revelam um tipo celular com características tanto de fibroblastos, como de células musculares lisas, que poderiam ter um papel importante na patogênese da hipertensão portal.

2.2. REPARO

2.2.1-Generalidades

Em tecidos que apresentam células especializadas, tais como a derme, as quais nem sempre respondem à agressão por regeneração completa, é comum o desenvolvimento do processo de reparo, no qual o tecido original é repostado por tecido conectivo não específico, constituindo uma cicatriz. O dogma central do reparo, via de regra, é sempre o mesmo, a saber, “fechar” o ferimento e selá-lo com uma cicatriz (MAJNO et al., 1996).

EHRICHMAN et al. (1991) salientaram que o reparo é um evento dinâmico, compreendendo diferentes processos, entre os quais são listados, a inflamação, proliferação celular e síntese dos elementos que constituem a matriz extracelular, bem como seu posterior remodelamento.

Segundo CALVIN et al. (1998), a prioridade crucial, no reparo, é a hemostasia. Inicialmente, as arteríolas lesadas contraem e o sangue extravasado coagula. A inflamação é uma resposta tecidual localizada, protetora, provocada por lesão com destruição de tecidos, que serve para eliminar, diluir ou “varrer” o agente lesivo. A inflamação precoce é caracterizada pela formação do coágulo dentro dos vasos lesados resultando na cessação da hemorragia, e possibilitando a geração de uma matriz de fibrina, fibronectina e trombospondina. A formação do coágulo possibilita a migração de células para o microambiente da lesão e, adicionalmente, serve de estímulo para a proliferação dos fibroblastos (SIEGBAHN et al., 2000).

Além dos aspectos celulares, a síntese do coágulo envolve também alguns fatores humorais. O fator XII que é ativado pela adsorção ao colágeno fibrilar exposto, desencadeia a ativação da cascata das cininas e do complemento, o que inclui a clivagem de uma série de proteínas séricas, culminando com a geração de bradicinina e das anafilatoxinas, respectivamente. A bradicinina e as anafilatoxinas aumentam a permeabilidade vascular e agem como potentes agentes quimiotáticos, estimulando neutrófilos e outros grupos celulares a liberar mediadores vasoativos como histamina e leucotrienos, bem como enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio. Adicionalmente, ZWIRNER et al. (1998) demonstraram *in vitro* que a anafilatoxina C3a pode contribuir para a migração de macrófagos nos sítios específicos da inflamação.

Inicialmente, há predominância de infiltrado neutrofílico. Os neutrófilos migram para os tecidos, através das vênulas, com o objetivo de fagocitar debris e possíveis bactérias. Em um estudo experimental utilizando-se porcos da Índia, FENG et al. (1998) sugeriram que a migração neutrofílica na inflamação aguda pudesse ocorrer não somente pelas junções interendoteliais, mas também através destas células. Em um determinado momento, geralmente por volta do segundo dia, passa a haver a predominância de macrófagos, os quais se originam a partir da diferenciação do seu precursor sangüíneo, o monócito. Os macrófagos produzem uma série de fatores quimiotáticos, e liberam collagenases, a fim de viabilizar a degradação do material necrótico.

TONNESEN et al. (2000) relatam que poucos dias após a ocorrência de uma lesão, tem início uma nova formação tecidual, com intensa proliferação

celular representada principalmente por fibroblastos e células endoteliais, dispersos em uma matriz de tecido conjuntivo frouxo rica em colágeno dos tipos I e III, fibrina, fibronectina e proteoglicanos. Estes elementos constituem o tecido de granulação. A formação deste tecido especializado ocorre em virtude de crescente fibroplasia e angiogênese. Ao mesmo tempo, os fibroblastos alteram o seu fenótipo, passando a expressar temporariamente actina alfa de músculo liso, recebendo a denominação especial de miofibroblastos. Estas células são mantidas unidas através de junções comunicantes, e os seus filamentos citoplasmáticos de actina e vinculina se ligam através dos receptores das integrinas, às fibrilas de fibronectina e aos colágenos I e III da matriz extracelular. Estas interações entre as células e a matriz provêm um meio pelo qual ocorre a contração tecidual (GABBIANI, 1999).

O tecido de granulação vai sendo gradualmente remodelado, formando um tecido cicatricial, que é menos celular e vascular. Alguns autores afirmam que o decréscimo celular pode ser justificado pelo fenômeno de apoptose (GRANVILLE et al., 1998). Com o remodelamento, vai havendo redução de ácido hialurônico e fibronectina, os quais são degradados por células e metaloproteinases plasmáticas, e concomitantemente, processa-se o crescente acúmulo de colágeno tipo I.

Paralelamente a todos os eventos supracitados, as células epiteliais de revestimento, sob a ação de citocinas específicas, proliferam e migram a partir das bordas do ferimento, na tentativa de fechá-lo. Este processo é denominado reepitelização. MARCHESE et al. (1995) investigando a expressão e distribuição

do fator de crescimento de queratinócitos e seu respectivo receptor durante o processo de reparo em humanos, verificaram que havia uma modulação temporal dos mesmos ao longo da cicatrização, e que tais elementos estariam fortemente relacionados ao fenômeno de reepitelização.

2.2.2- O papel das citocinas no reparo

Imediatamente após o trauma, o dano tecidual induz a liberação de citocinas por parte das células endoteliais e queratinócitos, dando início às primeiras alterações inflamatórias. As citocinas quimiotáticas sintetizadas pelas células endoteliais e demais células presentes no tecido, provêem o recrutamento seletivo de leucócitos para os sítios da inflamação (EPSTEIN, 1998). O dano tecidual inicial resulta na desgranulação de plaquetas, as quais secretam citocinas, incluindo TNF- α , TGF- β e PDGF. A liberação de TNF- α e IL-1 derivada de queratinócitos, estimula a expressão de E-selectinas por parte das células endoteliais e induz a expressão de ICAM-1 endotelial, permitindo o recrutamento seletivo de monócitos e linfócitos para o local da lesão.

Segundo BOREL et al. (1998), os monócitos que chegam ao tecido e ali se fixam, começam a secretar IL-1 e TNF- α , recrutando novas células, e através da produção de PDGF e TGF- β , eles também estimulam a síntese de matriz extracelular por parte dos fibroblastos e a formação do tecido de granulação. Os fibroblastos sintetizam colágeno do tipo I, III e fibronectina. No que diz respeito à angiogênese, este processo biológico ocorre mediante a proliferação de capilares em resposta ao TGF- β e FGF.

De acordo com THOMAS et al. (1995), a reepitelização é estimulada por EGF e TGF- α , os quais induzem a migração dos queratinócitos através do leito do ferimento. Concomitantemente, processa-se o início da maturação da matriz extracelular, caracterizando-se pelo remodelamento das fibras de colágeno tipo I e a regressão da trama de capilares. Uma vez postulado que aqueles polipeptídeos biologicamente ativos podem estimular a angiogênese, a proliferação fibroblástica e a produção de colágeno, eles tem sido largamente usados em ferimentos induzidos experimentalmente (FOLKMAN, 1992).

2.2.3- Fatores que interferem no reparo

Embora o reparo seja poderosamente programado, algumas intempéries podem dificultar o seu processamento. Muitos fatores gerais e locais podem interferir no mecanismo de reparo e influenciar a evolução deste processo. O mais importante deles, é o estado nutricional do indivíduo. KAY et al. (1987), através da realização de um estudo prospectivo envolvendo a análise do processo cicatricial em pacientes submetidos à amputação das extremidades inferiores, relataram que, no grupo representado pelos indivíduos mal-nutridos, cerca de 40% da amostra, exibiu complicações sistêmicas ou locais no período pós-operatório.

Durante muito tempo, vem sendo demonstrado, que a carência de proteínas representa um sério comprometimento na síntese enzimática, bem como na produção de moléculas essencialmente polipeptídicas, tais como anticorpos, hormônios, colágeno, entre outros (FAULK et al., 1974). A síntese do

colágeno depende da vitamina C, a qual se constitui em um componente fundamental na etapa de maturação molecular desta proteína, e a sua deficiência é acompanhada de uma cicatrização defeituosa e da formação de um colágeno imaturo, sem força tênsil (in GROSS, 2000).

Segundo EHRLICHMAN et al. (1991), o oxigênio molecular é um fator central no processo de reparo. Ele é necessário para a realização de todos os fenômenos biológicos dependentes de energia, tais como a replicação celular, síntese protéica, exportação de proteínas e a hidroxilação da prolina e lisina, para a posterior incorporação destes aminoácidos às cadeias alfa da molécula de colágeno. De fundamental importância, é a elevada tensão superficial do oxigênio nos tecidos a fim de potencializar a resistência às eventuais infecções. O oxigênio molecular é imprescindível para a produção de radicais superóxidos tóxicos, os quais, em contrapartida, são usados para eliminar as bactérias que tenham sido eventualmente fagocitadas pelos granulócitos (PAUL, 1999).

Como o sistema imunológico representa um elemento fundamental na geração das diversas citocinas que participam ativamente do processo de reparo, indivíduos em estado de imunossupressão podem apresentar um retardo considerável na cicatrização (HULSEWÉ et al., 1999).

De acordo com TIMIMI et al. (1998), algumas patologias sistêmicas, tais como o *diabetes mellitus*, podem dificultar a cicatrização de um ferimento, basicamente em virtude da microangiopatia e uma maior predisposição à infecção apresentada por parte dos seus portadores. Indivíduos com arteriosclerose ou

anormalidades venulares podem apresentar um impedimento da cicatrização em virtude do retardo na drenagem venosa e suprimento sanguíneo inadequado.

Do ponto de vista local, a permanência da crosta que recobre a lesão é de vital importância para a proteção dos tecidos subjacentes em formação. A sua remoção precoce pode resultar em atraso da cicatrização, principalmente gerando um rompimento da fina rede capilar neoformada. A área da ferida também precisa estar desprovida de qualquer fator de natureza infecciosa, corpos estranhos e restos de tecidos desvitalizados, os quais poderiam perturbar a cicatrização. Adicionalmente, alguns fatores mecânicos, como o movimento precoce envolvendo a área do ferimento podem retardar o reparo (ANDRADE, 1999).

2.3. LASER

2.3.1. Generalidades

Laser é o acrônimo de “Light amplification by estímulated emission of radiation”, ou seja, “luz amplificada por emissão estimulada de radiação”. Já no início do século XX, em 1917, Albert Einstein descreveu os princípios físicos da emissão estimulada de radiação. No ano de 1960, na Califórnia, MAIMAN criou o primeiro aparelho de laser a rubi e no ano subsequente, foi realizada a primeira cirurgia oftalmológica com laser para remoção de um tumor de retina. Em 1961, Javan desenvolveu o primeiro laser com finalidade terapêutica, um He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm. As aplicações clínicas do laser de baixa potência foram preconizadas por Mester, no ano de 1966, na Hungria, o qual

publicou uma série de relatos de casos clínicos abordando a propriedade de bioestimulação sobre a cicatrização de úlceras crônicas de membros inferiores, utilizando lasers de rubi e de argônio (BRUGNERA JÚNIOR & PINHEIRO, 1998).

Durante as décadas de 70 e 80, embora o laser terapêutico mais usado fosse o do tipo He-Ne, começaram a ser desenvolvidos diodos lasers semicondutores, os quais exibiam um maior potencial de penetração tecidual, e podiam operar nas formas contínua ou pulsada. Em 1981, surgiu o primeiro relato da aplicação clínica de um diodo laser As-Ga-Al em um estudo comparativo que visava avaliar a atenuação do quadro algico de alguns pacientes (TUNÉR & HODE, 1999). A partir dos anos 90, foram introduzidos diferentes diodos laser, capazes de gerar uma ampla faixa de comprimentos de onda, constituindo-se em pequenos aparelhos, de fácil transporte e manuseio, e custo relativamente baixo.

O laser é um tipo de onda eletromagnética que pode ser visível ou não, a depender do comprimento de onda em questão. Esta onda aporta uma alta concentração de energia e é constituída por muitos fótons. Neste âmbito, por meio da irradiação, a matéria é estimulada através do fornecimento de energia aos átomos que a constituem.

Quando um fóton encerrando uma quantidade específica de energia, entra no campo eletromagnético dos átomos excitados pela energia previamente armazenada, uma parte dela é emitida através da criação de um outro fóton idêntico ao primeiro. O fóton inicial não é absorvido, de modo que, tanto este, como o segundo gerado a partir dele, podem estimular outros átomos no meio

laser a emitir a sua energia armazenada (LEINWOLL, 1965). Processa-se então, uma “avalanche” de luz, desencadeada por todos os fótons gerados com exatamente a mesma energia. Esta reação em cadeia dos fótons resulta em uma luz laser monocromática e coerente (McCOMB, 1988). A coerência, por exemplo, diz respeito à propagação ordenada das ondas eletromagnéticas ao longo do tempo e do espaço. Com relação à luz normal, o laser apresenta um paralelismo muito acentuado. As suas ondas eletromagnéticas exibem um mesmo sentido e direção, de modo que o ângulo de divergência do laser é muito pequeno. Segundo GENOVESE et al. (1991), a emissão de uma radiação com uma linha espectral muito estreita, ou seja, com um comprimento de onda muito bem definido, constitui o que se reconhece por monocromaticidade.

De acordo com a substância estimulada a emitir a radiação, pode-se obter diferentes tipos de luz laser. Foram propostas muitas classificações para os diversos tipos de laser existentes. De acordo com GENOVESE et al. (1991), os lasers podem ser divididos em dois grandes grupos: os lasers não cirúrgicos, que se caracterizam por um tratamento de baixa intensidade, e os lasers cirúrgicos, por tratamento de alta intensidade. O meio ativo destes lasers pode variar e geralmente inclui material sólido, líquido, gasoso ou quaisquer um destes componentes associados um ao outro.

GARCIA (1997), descrevendo os tipos de lasers existentes, salientou que os lasers não cirúrgicos, também chamados de terapêuticos, não geram calor e são geralmente indicados para a melhoria da cicatrização, proporcionando efeitos analgésicos, antiinflamatórios e bioestimulantes, entre muitos outros benefícios.

Os lasers terapêuticos comumente utilizados, e seus respectivos comprimentos de onda, estão listados no quadro 01.

Quadro 01: **Classificação dos lasers de baixa potência**

Tipo de laser	Comprimento de onda
HeNe	633nm
InGaAIP	633-5 nm
GaAlAs	780-830 nm
GaAs	904 nm
CO ₂	10600 nm
Rubi	694 nm
Nd:YAG	1064 nm

Fonte: TÚNER & HODE

2.3.2. Alterações bioquímicas, celulares e moleculares promovidas pela laserterapia

Durante os últimos anos, estudos sistemáticos tem sido conduzidos utilizando-se bactérias e culturas de células, a fim de esclarecer a ação da luz laser a nível molecular (KARU, 1989). Os dados experimentais coletados a partir destes estudos, demonstram que, comparativamente baixas doses e períodos de tempo curtos de irradiação, provocam um macroefeito que permanece por um longo tempo.

O mecanismo de ação do laser de baixa potência ainda vem sendo gradativamente entendido. Muitas hipóteses tem sido propostas, as quais incluem estímulo para a captação de ácido ascórbico pelas células, estimulação de fotoreceptores na cadeia respiratória da mitocôndria, mudanças nos níveis de ATP ou AMPc e estabilização da membrana celular (KARU, 1987). Um grande número de autores afirma que a energia a ser depositada num determinado tecido por unidade de superfície deve situar-se entre 1 a 6 J/cm². Todavia, a eleição da dosimetria adequada pode variar em virtude do tipo da patologia a ser tratada, da profundidade da lesão, seu tempo de duração, o tipo do tecido, a idade do paciente e sua condição sistêmica, entre muitos outros fatores.

De acordo com BASFORD (1995), os lasers de baixa magnitude tem sido usados em pesquisa e na clínica por quase 30 anos a fim de modular função celular, aliviar a dor e acelerar a cicatrização. O principal alicerce da laserterapia é que a irradiação laser tem uma capacidade de alterar o comportamento celular dependente do comprimento de onda utilizado, na ausência da geração de calor. A aceleração da cicatrização está entre as primeiras alterações descritas, e investigadores pioneiros acreditaram que a irradiação laser pudesse estimular processos biológicos. Segundo o autor, na prática, a laserterapia envolve tipicamente o emprego de 1 a 4 J/cm² nos sítios de tratamento, utilizando-se de 10 a 90 mW de potência. Comenta ainda que, independentemente das similaridades da dose e do tipo de laser utilizado, diferenças significativas ainda persistem, no que diz respeito às abordagens de tratamento. Entre estas diferenças, estão a frequência de pulso, localização da ponta de aplicação do

aparelho e o uso de diferentes comprimentos de onda únicos ou combinados. Também de fundamental importância são a irradiância, a área da ponta ativa, a polaridade, duração de pulso, entre outras variáveis.

Relata-se que a radiação laser de baixa potência pode afetar consideravelmente o metabolismo celular e incrementar o seu potencial regenerativo, além de gerar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e vasodilatadores (CONLAN et al., 1996). Estes efeitos parecem estar associados à foto-recepção mitocondrial da luz monocromática, uma vez que o laser acelera o metabolismo respiratório de certos grupos celulares (MEYERS, 1990).

As evidências indicam que o evento físico inicial na bioestimulação é representado pela absorção de luz por moléculas específicas no tecido alvo, as quais se constituem os chamados cromóforos. As enzimas da cadeia respiratória presentes dentro das mitocôndrias, tem sido identificadas como os cromóforos “primários” (KARU, 1987). PASSARELA et al. (1984), verificaram aumento no potencial eletroquímico de prótons de hidrogênio, bem como na síntese de ATP em mitocôndrias isoladas a partir de hepatócitos de ratos, as quais foram irradiadas com laser de He-Ne.

LOEVSCHELL et al. (1994) analisaram *in vitro* os efeitos da irradiação laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos da mucosa oral humana, utilizando um laser de He-Ne com 4 mW de potência. Constatou-se que com a utilização da densidade de energia de 450 mJ/cm², houve um aumento estatisticamente significativo da incorporação de timidina ao DNA destas células,

sugerindo assim, que o laser de baixa intensidade induz um aumento na síntese do DNA. Adicionalmente, NOBLE et al. (1992) observaram as características locomotórias de fibroblastos derivados de ventrículos de embriões dispostos num gel tridimensional de colágeno sob a ação do laser de He-Ne, e concluíram que, embora a locomoção não ficasse bem evidenciada, houve uma transformação fenotípica destas células, as quais passaram a exibir um desenvolvimento mais acentuado do seu aparato locomotor.

SKINNER et al. (1996) utilizaram um laser de Ga-As pulsátil empregando diferentes irradiâncias em cultura de fibroblastos de embriões humanos, e observaram que houve um aumento significativo nos níveis de colágeno por parte das células irradiadas, através de um ensaio com incorporação de prolina tritiada.

2.3.3. Laserterapia na cicatrização

O princípio da bioestimulação com laser foi introduzido há mais de 20 anos atrás e foi aplicado primariamente na dermatologia, para cicatrização de ferimentos cutâneos. Em 1971, MESTER et al., realizaram um estudo histológico em ratos, induzindo dois ferimentos por queimadura de 3^o grau, no dorso dos animais, com um eletrodo esférico de 4 a 5 mm de diâmetro. Um lado foi tratado duas vezes por semana, durante três semanas, e o outro, foi adotado como controle. O aspecto macroscópico dos ferimentos foi acompanhado através de fotografias seriadas. Ao exame histológico, os autores concluíram que o laser estimulou a regeneração, produzindo um aumento na taxa de crescimento

epitelial, uma vez que a cicatrização processou-se mais rapidamente nos ferimentos tratados.

GOMEZ-VILLAMANDOS et al. (1995), objetivando investigar a eficácia da terapia laser na cicatrização de ferimentos na mucosa faríngea eqüina, induzidas com ácido sulfúrico, constataram que o laser produziu uma cicatrização mais rápida do ferimento devido ao aumento da atividade mitótica, aumento no número de fibroblastos, proliferação de colágeno e neovascularização, quando comparado ao ferimento controle. O laser utilizado foi do tipo He-Ne com 10 mW de potência, comprimento de onda da ordem de 632,8 nm e a densidade de energia empregada foi de 8 J/cm². As úlceras foram irradiadas diariamente até a completa cicatrização das lesões com três pontos de aplicação por sessão. O estudo histológico dos controles revelou necrose de coagulação do epitélio, e do tecido conectivo, bem como intenso infiltrado inflamatório, edema e microtrombos nos capilares, ao passo que, nos irradiados, observou-se um infiltrado inflamatório mais discreto e redução do edema.

Alguns autores observaram que a produção de FGF por parte dos fibroblastos em meio de cultura aumentava consideravelmente após a irradiação com laser de baixa potência, e sugeriram que a proliferação de fibroblastos estimulada pelo laser pode estar relacionada à produção autócrina de FGF. O FGF, por sua vez, tem propriedades mitogênicas e angiogênicas que indicam que ele pode aumentar a formação do tecido de granulação e promover o reparo do tecido conectivo (YU et al., 1994).

OLIVEIRA (1992) realizou um estudo histológico em ratos, extraíndo os incisivos inferiores dos mesmos, a fim de avaliar o grau de cicatrização dos ferimentos resultantes da extração após o tratamento com laser de baixa potência, do tipo Ar-Ga. O autor constatou que a aplicação do laser promoveu a aceleração da cronologia do reparo alveolar, bem como favoreceu a ocorrência do fenômeno de reepitelização mais rápido, sendo que, os maiores ganhos na cicatrização, ocorreram nos períodos pós-operatórios compreendidos entre 6 a 15 dias. Concomitantemente, MAREI et al. (1997) verificaram que a bioestimulação pôde ser muito útil para a melhora da cicatrização em ferimentos na mucosa oral.

BISHT et al. (1994) estudaram os efeitos da laserterapia com um laser do tipo He-Ne com 5 mW de potência, aplicando 4 J/cm² durante 5 minutos em ferimentos cutâneos abertos confeccionados em ratos albinos. Os autores observaram que houve uma aceleração estatisticamente significativa do processo cicatricial, com incremento do tecido de granulação e rápida reepitelização nos grupos tratados quando comparados aos controles. Um estudo semelhante foi proposto e executado por BRAVERMAN et al. (1989), no qual lasers com diferentes comprimentos de onda foram empregados, para avaliação da cicatrização cutânea em coelhos. Os ferimentos cutâneos foram irradiados diariamente até o 21^o dia após a sua confecção, e ao exame histológico, o crescimento epitelial foi mais exuberante no grupo tratado, embora a diferença não fosse significativa estatisticamente.

Sendo assim, além dos estudos científicos supracitados, muitos outros, confirmam a efetividade da laserterapia na cicatrização e continuam a ser

desenvolvidos, independente de serem alvos de constante incredulidade por parte de alguns investigadores.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar as principais modificações morfológicas na cicatrização, com enfoque especial no papel dos miofibroblastos, após a indução de ferimentos cutâneos em ratos que foram submetidos à terapia pós-cirúrgica com laser de baixa potência.

3.2. Específicos

- Analisar histologicamente as diferentes fases do processo de cicatrização após cirurgia cutânea, com e sem a aplicação do laser de baixa potência.

- Registrar, através de marcadores específicos utilizados em imunohistoquímica, a expressão de miofibroblastos no leito do ferimento.

- Analisar a eficácia do uso da terapia pós cirúrgica com laser de baixa potência e a sua influência como bioestimulador sobre os grupos celulares envolvidos no processo cicatricial, em especial, os miofibroblastos.

4 JUSTIFICATIVA

No que diz respeito à participação dos miofibroblastos no processo cicatricial, incontestavelmente atribuí-se a este grupo celular a propriedade de contração do ferimento, uma vez que a célula em questão apresenta um aparelho contrátil, semelhante ao das fibras musculares lisas. Sabe-se que, em estudos realizados *in vivo*, o laser de baixa densidade de potência pode estimular a diferenciação fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990). O presente estudo experimental procurará contribuir para um melhor entendimento dos efeitos da laserterapia sobre alguns componentes da matriz extracelular e elementos celulares presentes neste compartimento, durante etapas distintas do processo de cicatrização.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 72 ratos Wistar, com peso variando entre 150 a 250 gramas e idade aproximada de 3 meses. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais para impedir qualquer intercorrência no curso da cicatrização dos ferimentos cutâneos. Os animais eram alimentados com ração comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento, sob condições similares de temperatura, umidade e iluminação. A alocação dos animais para os diversos grupos experimentais foi randômica.

5.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E SACRIFÍCIOS

Foram elaborados seis grupos experimentais com a finalidade de caracterizar a evolução do processo cicatricial ao longo do tempo, delineados na tabela 01. Os procedimentos operacionais foram executados na pele do dorso dos animais. Cada grupo era constituído por seis subgrupos, representados pelos dias de sacrifício:

Grupo I – Controle. Vinte e quatro animais submetidos à intervenção cirúrgica que não receberam nenhum tipo de tratamento específico.

Grupo II – Vinte e quatro animais tratados com laser de baixa potência, recebendo 1 J/cm^2 por ponto de aplicação, perfazendo um total de 4 J/cm^2 de

densidade de energia nas adjacências da área correspondente ao ferimento, imediatamente após a cirurgia.

Grupo III – Vinte e quatro animais tratados com laser de baixa potência com aplicação pontual de 2 J/cm² de densidade de energia após o procedimento cirúrgico, totalizando 8 J/cm² irradiados na área afetada.

Tabela 01: **Caracterização dos grupos e respectivos dias de sacrifício**

Grupos experimentais	Sacri�f�cio					
	24 horas	48 horas	72 horas	05 dias	07 dias	14 dias
Controle (n)	4	4	4	4	4	4
Laser 4 J/cm² (n)	4	4	4	4	4	4
Laser 8 J/cm² (n)	4	4	4	4	4	4

Inicialmente, determinou-se o peso dos animais a serem utilizados para viabilizar o emprego de solução anestésica em doses efetivas para a sedação. A anestesia foi previamente preparada utilizando-se quetamina (Ketalar) e xilasina (Rompum). A quantidade de quetamina utilizada foi de 2,5 ml e de xilasina, 0,5 ml.   esta diluição acrescentou-se 1 ml de salina a 0,85%, perfazendo um total de 4 ml de solução anestésica. Os animais eram anestesiados, recebendo 0,2 ml do anestésico para cada 100 gramas de peso, por via intraperitoneal. Em seguida, foram submetidos à tricotomia da região dorsal. Utilizando-se um bisturi circular de 8 mm de diâmetro (Biopsy punch – Stiefel), foram executadas cirurgias cutâneas, removendo-se um segmento da epiderme e da derme (prancha 1,

figuras A e B). As bordas do ferimentos não foram confrontadas com nenhum tipo de fio de sutura para que a cicatrização ocorresse por segunda intenção.

5.3. APLICAÇÃO DO LASER

Realizado o ferimento, parte dos animais foi tratada com laser de baixa potência, em única sessão após a cirurgia, executando-se aplicação pontual. O laser foi aplicado em quatro pontos de eleição situados nas margens do ferimento (prancha 2, figura A). O aparelho empregado obedecia as especificações descritas no quadro 02 (prancha 2, figura B).

Quadro 02: **Especificações do aparelho laser de baixa potência**

LASER VR- KC- 610

Emissor do laser: Diodo Ga-As-Al semi-condutor

Potência contínua do diodo laser: 9 mW

Comprimento de onda: 670 nm (visível em vermelho)

Marca comercial: Dentoflex

No grupo tratado, a ponta do aparelho foi recoberta com plástico de cloreto de polivinila (Filmito – Kentinha). O tempo utilizado para cada aplicação seguiu a equação proposta por TÚNER & HODE (1999), a saber:

$$T(s) = \text{densidade de energia (J/cm}^2\text{)} \times \text{área do } spot \text{ size (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Potência (W)}$$

Inserindo-se os valores à fórmula supracitada, pôde-se chegar ao tempo apropriado para a duração de cada aplicação pontual, tanto de 1 J/cm², como de 2 J/cm², descritos nos quadros 03 e 04, respectivamente.

Quadro 03: Definição do tempo de exposição ao laser utilizando-se 1 J/cm² de densidade de energia

$$T = \frac{1 \times 28,27 \times 10^{-2}}{9 \times 10^{-3}}$$

$$9 \times 10^{-3}$$

$$T = \frac{28,27 \times 10}{9}$$

$$9$$

$$T = 31''$$

Quadro 04: Definição do tempo de exposição ao laser utilizando-se 2 J/cm² de densidade de energia

$$T = \frac{2 \times 28,27 \times 10^{-2}}{9 \times 10^{-3}}$$

$$9 \times 10^{-3}$$

$$T = \frac{28,27 \times 20}{9}$$

$$9$$

$$T = 62''$$

A potência do laser no aparelho utilizado, foi calibrada no laboratório de laser do Instituto de Química, da Universidade Federal da Bahia, com e sem o recobrimento da ponta ativa com o plástico de cloreto de polivinila. Para o cálculo da medida da área do *spot size*, ou seja, da área da ponta de saída do feixe luminoso, utilizou-se um espcímetro (OTTO) de aço inoxidável com escala de 0,1 a 10 mm².

Após o procedimento cirúrgico, as espécimes foram mantidas sob isolamento individual e diariamente inspecionadas para análise de possíveis sangramento, perda da crosta e formação de exsudato purulento. A medida da ferida cirúrgica foi realizada utilizando-se um compasso (Kern-Swiss), e fazendo-se o registro da mesma em planilha, na qual anotavam-se as aferições tanto no sentido crâneo-caudal, como látero-lateral, para a determinação do cálculo da área do ferimento.

Nos respectivos tempos, os animais foram sacrificados com éter etílico, sob campânula. Constatado o óbito, os fragmentos de pele englobando toda a área afetada foram coletados, distendidos em cartolina e imersos em formol tamponado (Milloning). Com aproximadamente 18 horas de fixação, os tecidos foram seccionados em sentido longitudinal, abrangendo o centro da lesão, com lâmina de aço inoxidável e processados histologicamente.

5.4. MICROSCOPIA ÓPTICA

5.4.1 Colorações de rotina

Fragmentos de tecido cutâneo foram fixados em formol tamponado, incluídos em parafina histológica e cortados em micrótomo, obtendo-se cortes com espessura de 3,0 micrômetros, os quais foram corados pelos seguintes métodos: hematoxilina-eosina, orceína para fibras elásticas e sítius vermelho para fibras colágenas. A análise histológica de todas as secções foi realizada sem o conhecimento prévio dos grupos a que os animais pertenciam. O sistema de cruzes foi adotado para a gradação do edema e infiltrado inflamatório, bem como a determinação dos diferentes níveis de síntese de colágeno e fibras elásticas na matriz extracelular ao longo do tempo do experimento, obedecendo à gradação descrita no quadro 05.

Quadro 05: Gradação da intensidade das alterações histopatológicas observadas

Número de cruzes	Classificação
0	Ausente
+	Discreto
++	Moderado
+++	Intenso

5.4.2. Imunohistoquímica

Em lâminas tratadas previamente com solução de organo-silano (A 3648 - Sigma), foram obtidas secções teciduais de três micrômetros a partir de blocos de parafina contendo tecido cutâneo dos ratos estudados no presente trabalho.

Procedeu-se à desparafinização dos cortes histológicos, submetendo as lâminas a banhos sucessivos com xilol. Em seguida, as mesmas foram hidratadas em soluções com diversas concentrações de álcool e lavadas em água corrente e destilada. Em virtude das marcações não ficarem visualizadas de maneira adequada previamente em lâminas teste, foi realizado um tratamento das lâminas a serem usadas no estudo com tampão citrato (pH 6.0) em microondas, perfazendo um total de 3 ciclos, a fim de possibilitar a recuperação antigênica. Após este procedimento, as lâminas resfriaram em temperatura ambiente.

Em seguida, as mesmas foram novamente lavadas em água corrente, água destilada e solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,16 M, pH 7,4, para que o bloqueio das ligações inespecíficas fosse realizado com leite desnatado em pó a 10% em PBS, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Os tecidos foram incubados com anticorpo primário monoclonal diluído em PBS por uma noite em câmara úmida a 4° C.

No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da geladeira e expostas à temperatura ambiente por uma hora. Novas lavagens com PBS foram realizadas, e o anticorpo secundário foi utilizado por 20 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol, por 10 minutos, à temperatura ambiente. A partir desta etapa, utilizou-se o complexo streptavidina-biotina por vinte minutos, a 37° C. A revelação do anticorpo foi realizada com Diaminobenzidina (DAB), sendo que este reativo cromogênico foi dissolvido em PBS, guardado da luz, e filtrado. À esta

solução, adicionou-se como substrato o peróxido de hidrogênio, o qual foi preparado na hora do uso. Para a contra-coloração, utilizou-se hematoxilina de Gil e verde metila, filtrados no momento em que seriam utilizados.

Os cortes foram novamente lavados em água corrente e destilada, desidratados em soluções alcoólicas com diferentes concentrações e clarificados com xilol para a posterior montagem das lâminas com lamínula e bálsamo do Canadá.

No presente trabalho, foi utilizado o Kit LSAB® 2, da DAKO laboratories (peroxidase for use on rat specimens – K609).

Cada anticorpo primário foi titulado antes do experimento propriamente dito, utilizando-se cortes de fibroadenoma e útero de rata. As especificações dos anticorpos monoclonais utilizados para a marcação dos filamentos protéicos do citoesqueleto celular constam na tabela 02.

Tabela 02: Relação dos anticorpos primários monoclonais produzidos em camundongo

(Isotipo IgG)

DISCRIMINAÇÃO	CLONE	ESPECIFICIDADE	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	DILUIÇÃO
Actina de músculo liso	1A4	Actina alfa de músculo liso	Tampão citrato	1:800
Desmina	D33	Desmina	Tampão citrato	1:100
Vimentina	Vim 3B4v	Vimentina	E.D.T.A. Tripsinização Tampão citrato	1:200

Fonte: DAKO A/S

5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Durante a etapa de sacrifício dos animais, retirou-se fragmentos de tecido cutâneo para o processamento da técnica. Os cortes obtidos foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% e tampão cacodilato a 0,2 M, na proporção de 1:1, por uma hora a 4^o C. Em seguida, realizaram-se lavagens rápidas em tampão cacodilato a 0,2 M. A pós-fixação foi feita com solução de tetróxido de ósmio a 2% e cacodilato 0,2 M, na proporção de 1:1, por uma hora a 4^o C. Realizada esta etapa, os fragmentos foram lavados em cacodilato a 0,3 M em temperatura ambiente, e desidratados em sucessivas diluições de acetona.

Posteriormente, foi realizada a substituição , sendo o material colocado em contato com uma mistura de Resina POLY-BED 812 e acetona pura por uma hora sob temperatura ambiental, seguindo-se impregnação com resina pura no vácuo, por 12 horas (“overnight”), nas mesmas condições de temperatura. Foi realizada a inclusão em moldes plásticos, os quais já haviam sido colocados em estufa a 37^o C para secar completamente.

Os moldes com os fragmentos teciduais foram novamente colocados em estufa a 60^o C, durante 3 dias, viabilizando assim, a polimerização da resina. Decorrida a polimerização, os moldes foram levados ao ultramicrotomo de marca Reichert-Supernova, para a confecção de cortes semi-finos de 1,0 um de espessura.

Após cuidadosa análise, as secções selecionadas foram submetidas aos cortes ultrafinos, de 450 Å, os quais foram contrastados com acetato de uranila, e em seguida, citrato de chumbo para análise ao microscópio eletrônico Zeiss EM-109, sob 50 kV.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores numéricos obtidos através do cálculo das áreas dos ferimentos cutâneos foram analisados estatisticamente, utilizando-se teste paramétrico One-way ANOVA para o estudo comparativo dos três grupos entre si. O teste *t* de Student foi aplicado para a identificação de diferenças significativas entre os grupos, considerando-se dois grupos separadamente para cada análise realizada. Foi utilizada a versão não paramétrica dos testes supracitados para a análise estatística dos valores obtidos com o estudo semiquantitativo. Os resultados foram considerados significantes quando apresentaram $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa de computador GRAPHPAD.

6 RESULTADOS

6.1. MACROSCOPIA

Durante o período pós-operatório, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal no local operado, sem evidências clínicas de infecção secundária. Adicionalmente, o aspecto clínico dos ferimentos revelou ausência de sangramento e de exsudato, ao passo que a crosta fazia-se presente e mais representativa com o desenrolar do processo cicatricial. Particularmente, em relação à formação da crosta sobre o ferimento, observou-se que somente por volta do 5^o dia, foi que a superfície do mesmo foi integralmente recoberta por esta estrutura. No 14^o dia após o procedimento inicial, todos os grupos exibiam reepitelização completa. Todavia, as diferenças mais marcantes envolveram a análise da área final dos ferimentos, nos respectivos dias de sacrifício. O diâmetro crâneo-caudal sempre apresentou as maiores reduções em milímetros quando comparado ao diâmetro látero-lateral. Nas primeiras 24 horas, os grupos apresentaram diminuição das áreas das feridas. Embora as diferenças observadas não fossem muito acentuadas entre os grupos, eram estatisticamente significativas. Setenta e duas horas após a realização da cirurgia, observou-se que os grupos de animais tratados com laser de baixa potência, apresentaram as maiores reduções em área do ferimento, quando comparados ao grupo controle. Este dado se repetiu nos dias subseqüentes, sendo que, por volta do 14^o dia pós-cirurgia, não foi mais possível realizar as aferições, uma vez que os animais exibiam reepitelização completa, exceto um animal pertencente ao grupo tratado com laser a 8 J/cm².

Paralelamente, observou-se que o grupo que recebeu 4 J/cm² de densidade de energia apresentou as maiores reduções da área do ferimento cutâneo em todos os pontos do sacrifício, quando comparado aos grupos controle e laser de 8 J/cm².

Os dados referentes às áreas acham-se descritos na tabela 03.

Tabela 03: **Média das áreas dos ferimentos em milímetros nos diferentes grupos estudados**

Grupos experimentais	24h	48h	72h	5d	7d	14d
	Média ± desvio padrão					
Tratados a laser						
4J/ cm ²	31,1 ± 3,2*	15,8 ± 4,0*	5,3 ± 2,0*	2,5 ± 0,9*	1,1 ± 0,3*	RC
8J/ cm ²	37,3 ± 9,7*	28,1 ± 9,7	18,5 ± 3,9*	15,3 ± 4,8	5,8 ± 2,6	RC
Controles	46,6 ± 2,7	31,1 ± 8,7	22,2 ± 6,3	15,8 ± 7,8	6,0 ± 2,1	RC

H= horas/ d= dias/ RC= Reepitelização completa/ *p< 0,05

6.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

No grupo de 24 horas após o procedimento cirúrgico, observou-se intenso infiltrado inflamatório, com presença de edema e diapedese. O infiltrado era predominantemente neutrofílico, com linfócitos e plasmócitos ocasionais. Na superfície do ferimento, haviam células necróticas exibindo núcleos picnóticos e

cariorrexe. Podia-se observar também nesta região, a crosta, resultante da coagulação da fibrina em contato com ar.

No grupo tratado com laser com densidade de energia de 8 J/cm^2 , embora o infiltrado celular fosse qualitativamente semelhante ao grupo controle, o edema era menos pronunciado e a congestão vascular não era tão intensa. Porém, quando estes dados foram confrontados com aqueles obtidos a partir do grupo tratado com 4 J/cm^2 , verificou-se que os aspectos histológicos não variavam muito de um grupo para o outro, e ambos exibiam alterações histológicas semelhantes. O estudo comparativo entre os três grupos demonstrou uma diferença estatisticamente significativa no que diz respeito ao edema tecidual (prancha 03; figuras A e B; gráfico 01).

A análise do grupo de animais que foram sacrificados 48 horas após a cirurgia, demonstrou que o grupo controle ainda apresentava um quadro histológico de inflamação aguda, com grande número de leucócitos polimorfonucleares e acentuado edema. Em um animal, observou-se também uma pequena área de necrose de coagulação na epiderme adjacente à área do ferimento. Nos grupos tratados com laser, utilizando-se diferentes densidades de energia, as diferenças apresentaram significância estatística (prancha 04; figuras A, B e C; gráfico 08). No infiltrado inflamatório, agora mais discreto, embora o elemento celular predominante ainda fosse o neutrófilo, a expressão de células mononucleares também era evidente. Em algumas secções, o edema era discreto e a congestão vascular menos pronunciada. Nestes grupos, as fibras musculares

lisas nas camadas mais profundas, abaixo da hipoderme, apresentavam uma invasão tecidual menos expressiva por parte das células do infiltrado.

O estudo semi-quantitativo do colágeno sintetizado pelas células presentes na matriz extracelular revelou que nos grupos de 24 e 48 horas, não haviam diferenças significativas entre todos os grupos e apenas esparsas fibras colágenas encontravam-se presentes na área do ferimento (prancha 05, figura A). Como na derme normal a concentração de fibras colágenas foi extremamente alta, o seu estudo serviu como referencial para o escrutínio comparativo com a área patológica.

No que diz respeito às fibras elásticas coradas pela orceína, observou-se que, nas adjacências do ferimento, representadas por áreas de pele normal, estas estruturas encontravam-se dispersas no estroma de tecido conjuntivo da derme, bem como situavam-se logo abaixo da mesma, um pouco acima do tecido muscular subjacente. Aquelas presentes nas túnicas elásticas das arteríolas coraram-se muito bem com a orceína, e possibilitaram uma análise do fenômeno de vascularização na área do ferimento. Nos grupos de 24, 48 e 72 horas, poucas fibras elásticas foram visualizadas, independentemente dos grupos estudados. Quando presentes, encontravam-se distribuídas esparsamente na matriz, sob a forma de pequenos filetes (prancha 05, figura B).

No que diz respeito à marcação com o anticorpo monoclonal anti-desmina, notou-se alguns aspectos peculiares nos diferentes grupos estudados. Tanto no grupo de 24, como no de 48 horas, percebeu-se que na área do ferimento,

representada pela presença do infiltrado inflamatório e edema, não houve marcação de células individuais desmino-positivas. A marcação foi positiva e facilmente visualizada em se tratando do músculo eretor do pêlo, e nas camadas musculares mais profundas, logo abaixo da hipoderme. O endotélio de pequenos vasos presentes na derme ficou também muito bem caracterizado. Estes achados foram semelhantes para todos os grupos, envolvendo os animais tratados e não tratados.

De uma maneira geral, a expressão de actina alfa de músculo liso não variou muito em comparação àquela realizada com o anticorpo monoclonal anti-desmina. A marcação, na realidade, foi idêntica à da desmina em todos os grupos estudados.

No grupo de animais que foram sacrificados 72 horas transcorrida a cirurgia, houve angiogênese e início do fenômeno de reepitelização. Nos grupos controles, ainda havia infiltrado inflamatório moderado, principalmente nas camadas mais profundas da hipoderme (prancha 05, figura C). O brotamento de capilares era evidente e na zona superficial, logo abaixo da crosta, já podia ser observado o início da reepitelização. O grupo laser que recebeu a aplicação de 4 J/cm² apresentou um quadro histológico mais favorável do que o grupo tratado com 8 J/cm². No primeiro, a reepitelização presente abaixo da crosta, apresentava um número de camadas epiteliais neoformadas maior. A angiogênese observada revelou um número considerável de novos capilares em formação, superior ao grupo controle. O infiltrado inflamatório, ainda presente, era discreto. As alterações do grupo III foram muito semelhantes às do grupo

controle, incluindo a presença de um infiltrado celular moderado e reepitelização menos acentuada. Todavia, uma diferença marcante que predominou nos grupos tratados com laser, em detrimento ao controle, desde as primeiras horas até este ponto de sacrifício, foi o grande contingente de mastócitos exibindo evidências de desgranulação. Estas células apresentavam-se dispostas mais profundamente na derme, logo acima da camada muscular do tecido cutâneo, nas adjacências dos capilares sangüíneos, exibindo diferentes densidades de grânulos no meio citoplasmático (prancha 06; figura A).

Os animais sacrificados nesta ocasião, apresentavam uma expressão de fibras colágenas gradativamente maior em relação aos animais sacrificados nos dois primeiros pontos do sacrifício. As fibras existentes começaram a apresentar um padrão mais organizado na área afetada. Com relação aos diferentes grupos, constatou-se que naqueles submetidos à laserterapia, a intensidade da coloração foi mais evidenciada, principalmente no grupo que recebeu 4 J/cm^2 de densidade de energia, embora estas diferenças não fossem estatisticamente significantes (gráficos 15).

Contudo, por volta de 72 horas após o término do procedimento cirúrgico, nos grupos tratados com o laser, já se podia visualizar uma maior expressão de células musculares ao redor do endotélio vascular marcadas positivamente tanto com o anticorpo anti-desmina, como com o actina-alfa de músculo liso, e uma expressão moderada de células positivas individualmente dispostas na área do ferimento, a qual foi estatisticamente significativa (prancha 06, figuras B e C; gráfico 27). O grupo que recebeu 4 J/cm^2 de densidade de energia, manifestou

uma marcação mais intensa, em virtude do maior número de vasos que proliferavam, os quais indicavam o desenrolar da angiogênese (prancha 07, figuras A e B). Comparativamente, embora o grupo de 8 J/cm² também apresentasse uma marcação mais evidente em relação ao grupo controle, com relação ao grupo II, ela foi menos intensa.

A partir do 5^o dia de sacrifício, observou-se a existência de um típico tecido de granulação na área correspondente ao ferimento. Este novo tecido foi caracterizado pela presença de vasos sangüíneos em formação e intensa proliferação celular. Constatou-se a presença do tecido de granulação em todos os grupos estudados (prancha 08, figura A). Neste grupo tratado com 4 J/cm², havia intenso brotamento capilar, sendo este aspecto presente também no grupo III, quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, no grupo controle, o infiltrado inflamatório persistiu, localizando-se em áreas focais da derme.

No tocante aos animais sacrificados 5 dias após o procedimento cirúrgico, a análise histológica foi enriquecida por uma maior expressão de fibras colágenas. Neste período, os grupos II e III, exibiam um padrão de organização mais evidente. As fibras encontravam-se mais coesas. O sítius vermelho corou de modo mais intenso feixes de fibras colágenas mais centralizados, e não somente fibras esparsamente distribuídas, conforme descrito nos grupos anteriores. O grupo controle apresentou um aspecto semelhante ao grupo anteriormente descrito de 72 horas. A expressão de colágeno era relativamente menos pronunciada. Todavia, não foi detectada significância estatística entre os grupos, neste ponto do sacrifício (gráfico 16). Em relação ao estudo das fibras elásticas,

podia-se observar uma maior distribuição de fibras individuais e expressão das mesmas em volta de pequenos vasos sangüíneos neoformados em todos os grupos. Nas áreas limítrofes do ferimento, parecia haver uma faixa contínua de fibras elásticas organizadas.

Conforme descrito anteriormente, no 5^o dia, havia tecido de granulação em todos os grupos estudados. As secções teciduais revelaram uma grande expressão de células fusiformes desminó e actino-positivas em meio ao tecido de granulação e com distribuição perivascular adicional (prancha 08, figuras B e C). Um achado histológico, não raro freqüente em ambos os grupos tratados com laser foi a formação de aglomerados de células, originando concentrações celulares circunscritas e localizadas ao longo da derme. No grupo controle, embora houvesse marcação positiva, não ocorria a formação destas aglomerações supracitadas, e a evidenciação de células individuais marcadas era mais discreta.

A observação dos animais sacrificados no 7^o dia após a cirurgia demonstrou que o processo cicatricial se desenrolou sem perturbações. No grupo controle, o fenômeno de reepitelização foi mais acelerado em comparação aos grupos tratados com laser. Embora todos os grupos exibissem proliferação epitelial a partir das margens da ferida em direção à sua região central, no grupo controle podia se observar a reepitelização quase completa do ferimento. No entanto, no que diz respeito ao tecido de granulação, ele fazia-se presente em todos os grupos estudados. Mais uma vez, o grupo II revelou um quadro histopatológico mais ameno em relação ao grupo III, não apresentando evidências

de células inflamatórias, sendo que, no último, ainda havia infiltrado inflamatório discreto, semelhante ao grupo controle.

O padrão histológico do grupo de 7 dias já encontrava-se semelhante àquele observado na derme normal, no que diz respeito às fibras colágenas. Concordemente, a coloração vermelha das fibras colágenas era mais intensa e as mesmas dispunham-se mais organizadas nos grupos tratados com laser, embora não se constatassem diferenças estatisticamente significativas (prancha 09, figuras A, B e C; gráfico 17). A expressão das fibras elásticas durante o 7^o e o 14^o dias foi muito semelhante. Elas apresentavam-se nas adjacências do tecido fibroso cicatricial, e a sua visualização na área da cicatriz propriamente dita, foi mínima. Adicionalmente, parece ter ocorrido uma restauração da camada de fibras elásticas dispostas abaixo da derme, à medida em que o reparo foi efetuado ao longo do tempo. Neste ponto de sacrifício, constatou-se que os grupos que foram submetidos à laserterapia, continuavam a apresentar marcação positiva de células individuais dispersas no estroma de tecido conjuntivo, ao passo que no grupo controle, este fato ocorreu com menor frequência. Com relação aos grupos II e III, que receberam respectivamente 4 J/cm² e 8 J/cm², a discreta supremacia do grupo II persistiu e também se tornou evidente, embora não se constatasse diferença estatisticamente significativa nesta ocasião.

A análise do processo cicatricial neste estudo foi realizada até o 14^o dia após a intervenção cirúrgica. Por volta desta ocasião, as diferenças entre os grupos não eram tão marcantes quanto nos períodos anteriores. Todos os animais exibiram nova formação epitelial completa e tecido cicatricial fibroso

destituído de anexos cutâneos (prancha 10, figura A). Na área correspondente à cicatriz fibrosa, a marcação com os anticorpos monoclonais foi uniforme, e ainda havia expressão de células individuais exibindo marcação positiva para desmina e actina-alfa de músculo liso. embora parecesse ter ocorrido um decréscimo desta população celular, em relação aos quadros histológicos visualizados nos 5^o e 7^o dias.

6.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Seguindo as evidências observadas na imunohistoquímica, os miofibroblastos apresentaram-se mais evidentes a partir do 5^o dia após ao procedimento cirúrgico. No entanto, o ponto de eleição considerado para o início das análises da microscopia eletrônica foi representado pelos animais sacrificados com 72 horas, uma vez que uma pequena amostra dos mesmos exibiam uma marcação positiva para actina alfa de músculo liso em células individuais.

O estudo realizado com base no material colhido decorridas 72 horas após o procedimento cirúrgico, revelou grande quantidade de exsudato, constituindo o edema. Havia a presença de poucas células, as quais eram eminentemente inflamatórias, com ênfase principal para a presença mais significativa de linfócitos e macrófagos, em detrimento aos outros tipos celulares. As fibras colágenas e elásticas apresentavam-se dissociadas em meio ao edema, e fibroblastos esparsos foram visualizados. Um aspecto observado na ultraestrutura destas

células, foi a presença de grandes vacúolos de gordura presentes no meio intracitoplasmático (prancha 11, figura A). Todavia, a evidência mais significativa, foi o grande número de fibroblastos em intensa atividade de síntese, apresentando núcleo proeminente e um retículo endoplasmático rugoso (prancha 11, figura B).

As observações realizadas no material colhido por volta do 5^o dia após a cirurgia revelaram uma vasta riqueza de detalhes no que diz respeito à matriz extracelular. Corroborando um achado histológico visualizado na microscopia óptica, foi visualizada a desgranulação dos mastócitos (prancha 12, figura A). Estas células apresentavam-se em diferentes estágios de desgranulação, algumas das quais exibiam um vasto arsenal de grânulos secretórios no citoplasma, ao passo que outras já exibiam evidências de desgranulação propriamente dita, revelando a liberação dos grânulos de secreção. Os fibroblastos continuavam a exibir um rico retículo endoplasmático rugoso e apresentavam-se muito mais numerosos, indicando assim, a continuidade do processo de síntese. Os leucócitos polimorfonucleares foram raramente observados, embora o edema ainda fosse pronunciado. Verificou-se a existência de macrófagos e linfócitos. Conforme confirmado pela técnica de imunohistoquímica, os miofibroblastos estavam presentes no tecido estudado. Muitas vezes apareceram nas micrografias, associados a fibroblastos em intensa atividade de síntese (prancha 12, figura B). Estas células compartilhavam aspectos morfológicos em comum com os fibroblastos e as células musculares lisas e apresentavam um aspecto fusiforme, um aparelho de Golgi bem desenvolvido, numerosas cisternas de retículo endoplasmático dilatadas,

mitocôndrias esparsamente distribuídas e microfilamentos, muitas vezes arrumados em discretas bandas abaixo da membrana citoplasmática.

Ao longo da membrana, exibiam os chamados corpos densos (prancha 13, figura A). Em algumas ocasiões, dois ou mais miofibroblastos apresentavam-se conectados, através de junções. O citoplasma destas células possuía inúmeras faixas de microfilamentos eletrodensos usualmente dispostas paralelamente ao longo eixo da célula, entre as quais pôde-se observar os corpos densos. Em um dado momento da análise eletrônica, constatou-se inclusive a presença de um miofibroblasto já diferenciado em músculo liso.

As observações do tecido coletado 7 dias após a confecção do ferimento cutâneo, revelaram a existência de muitos miofibroblastos. Alguns fibroblastos exibiam resíduos de colágeno no interior do citoplasma. Adicionalmente, as escassas células inflamatórias que persistiam no tecido apresentavam sinais de apoptose, revelando compactação das estruturas citoplasmáticas e condensação da cromatina nuclear (prancha 13, figura B). Constituindo-se em um achado ultraestrutural presente desde as 72 horas decorridas do ato cirúrgico, podia-se observar ainda por volta desta semana, a amplitude do endotélio. Os capilares apresentavam um endotélio alto, quimicamente ativado pela ação de inúmeras citocinas.

O material representativo do 14^o dia, revelou uma grande quantidade de fibras colágenas bem mais organizadas e densas, quando comparadas aos pontos de estudo posteriores. Algumas células esparsas apresentavam um

aspecto ultraestrutural distinto de outros tipos celulares conhecidos, com um significativo número de lisossomas dispersos ao longo do citoplasma. A presença de células mononucleares como os macrófagos, por exemplo, ainda era evidente (prancha 14, figura A). Todavia, um representativo contingente de fibroblastos demonstrava uma atividade de síntese diminuída, com redução do retículo endoplasmático rugoso, estando aparentemente em “repouso” (prancha 14, figura B).

7 DISCUSSÃO

O miofibroblasto tem sido considerado a principal célula efetora na contração de ferimentos, particularmente naqueles em que a cicatrização se processa por segunda intenção. Ele foi primariamente descrito por GABBIANI et al. (1971), como uma célula mesenquimal altamente especializada que compartilha aspectos morfológicos comuns aos fibroblastos e células musculares lisas. Além de estar presente em crescentes números no evento da contração tecidual, eles também podem se manifestar em doenças fibrocontráteis, fibrose intersticial e cirrose (KUHN et al., 1991; ADLER et al., 1989).

O presente estudo objetivou caracterizar as principais modificações na cicatrização cutânea, com enfoque especial para o papel desempenhado pelos miofibroblastos, em animais tratados com laser de baixa potência após o procedimento cirúrgico. Sendo assim, utilizou-se um modelo experimental largamente difundido na literatura mundial e apropriadamente empregado no estudo de cicatrizações envolvendo a epiderme e a derme, o qual consistiu na realização de ferimentos cutâneos circulares padronizados no dorso de ratos tricotomizados (KANA et al., 1981). Em se tratando de um experimento agudo, foram analisados os fenômenos exsudativos, bem como o início da fase representada pelos acontecimentos proliferativos. Entre estes, deteve-se singular atenção à fase proliferativa, a qual passou a exibir um padrão histopatológico característico já por volta da 72^o hora após a cirurgia cutânea.

A visualização do aspecto macroscópico dos ferimentos no presente estudo, demonstrou que os animais tratados com laser exibiram uma cicatrização mais rápida, e que a média das áreas dos ferimentos reduziu gradualmente com o

decorrer do tempo. Estes dados ratificam os achados de MESTER et al. (1971), que através da utilização de fotografias seriadas, as quais documentavam o processo de cicatrização cutânea de ratos, verificaram que os ferimentos tratados com laser, exibiram as maiores reduções dimensionais quando comparados aos não irradiados.

Além da ocorrência do fenômeno contrátil, a formação do tecido de granulação também representa uma etapa crítica na evolução do reparo tecidual. A análise detalhada do processo cicatricial descrita neste estudo confirma a presença de inúmeras células actina-positivas alocadas conjuntamente e distribuídas no estroma do tecido de granulação. Embora a existência dos miofibroblastos pudesse ser constatada 72 horas após o procedimento cirúrgico, a sua expressão foi mais intensamente caracterizada no ponto de sacrifício representado pelo 5^o dia pós-cirurgia. Em um modelo semelhante adotado para o estudo do processo cicatricial, HASAN et al. (2000) observaram aumentos significativos dos níveis de RNA mensageiro de actina alfa de músculo liso em ratos, empregando a técnica de hibridização *in situ*, à medida em que se formava a cicatriz fibrosa no tecido cutâneo destas espécimes. Uma possível explicação para o mecanismo de modulação fenotípica do miofibroblasto, parece estar relacionada com as atividades das citocinas TGF- β 1 e 3, as quais podem ser as principais responsáveis pela proliferação miofibroblástica, bem como a diferenciação destas células a partir de fibroblastos, durante a evolução do processo cicatricial (LANNING et al., 2000).

O perfil ultraestrutural do miofibroblasto é acentuadamente marcante. A presença de feixes de microfilamentos organizados no citoplasma e dos chamados corpos densos associados à sua membrana citoplasmática, bem como longas junções citoplasmáticas que possibilitam a integração desta célula com outras do mesmo tipo e com a matriz extracelular, tem sido visualizados através da microscopia eletrônica de transmissão (MAYER et al., 1997). Na avaliação ultraestrutural das secções confeccionadas neste trabalho, comprovou-se a existência dos aspectos supracitados e também, a ocorrência de um vasto retículo endoplasmático rugoso, denotando uma intensa atividade de síntese. Um outro achado ultraestrutural digno de nota, foi que por volta do 14^o dia após a realização dos ferimentos, poucos miofibroblastos foram observados, ao passo que alguns fibroblastos, exibiam acentuada diminuição do seu aparato reticular endoplasmático e internalização de colágeno. Esta descrição foi semelhante à realizada por GHADIALLY (1997), o qual concluiu que esta situação pode ocorrer em virtude de uma possível fagocitose do colágeno pelo fibroblasto e/ou diminuição da atividade de síntese do mesmo.

Com relação à histogênese deste importante elemento celular, o miofibroblasto, sabe-se que o mesmo pode ser proveniente da diferenciação de fibroblastos, células musculares lisas, pericitos, bem como outras células mesenquimais indiferenciadas presentes na matriz extracelular (in DAVIS et al., 1987). O conceito da chamada “família dos fibroblastos” proposto por ALBERTS et al. (1994), acrescenta que um grande número de células, incluindo miofibroblastos, osteoblastos, condrócitos, fibroblastos, células de ITO e adipócitos parecem ter uma origem comum e compartilham a capacidade de se

diferenciar umas nas outras. Analogamente, em estudo ultraestrutural desenvolvido em tecido adiposo subcutâneo de ratos, ANDRADE et al. (1998) sugeriram que pareceu haver uma transformação de adipócitos em fibroblastos após uma agressão aguda envolvendo a hipoderme.

As evidências obtidas a partir das eletromicrografias dos grupos tratados com laser e sacrificados por volta das 72 horas neste experimento em questão, revelaram a presença de fibroblastos contendo inúmeros depósitos de gordura, ao mesmo tempo em que apresentavam um rico retículo endoplasmático rugoso. Embora este aspecto representado ultraestruturalmente esteja em concordância com o anteriormente descrito, sabe-se que a origem mais provável dos miofibroblastos no tecido de granulação está vinculada à transformação fenotípica de fibroblastos (GABBIANI, 1994). As eletromicrografias representativas do 5^o e 7^o dias de sacrifício após a realização do ferimento cutâneo corroboram este conceito, uma vez que ficou evidente a interação de fibroblastos e miofibroblastos dispersos na matriz extracelular e uma aparente diminuição do número de fibroblastos, em comparação ao aumento do outro grupo celular considerado.

Uma vez que o principal indicativo da mudança fenotípica deste tipo celular é a expressão da actina alfa de músculo liso (DARBY et al., 1990), através do emprego da técnica de imunohistoquímica, utilizando-se um anticorpo monoclonal específico para o filamento intermediário em questão, observou-se que a marcação antígeno-específica apresentou-se mais expressiva por volta dos 5^o e 7^o dias de sacrifício. Estes dados confirmam as conclusões de SAPPINO et al. (1990), os quais descreveram que as células fibroblásticas presentes no tecido de

granulação representam o primeiro grupo celular do estroma que reconhecidamente expressam características morfológicas e funcionais de diferenciação em células musculares lisas com um citoesqueleto rico em actina alfa de músculo liso. Paralelamente, um grande número de autores sugerem que os miofibroblastos podem apresentar uma ampla variedade de fenótipos relacionados ao seu citoesqueleto (SCHMITT-GRÄFF et al., 1994). No processo de cicatrização, particularmente no tocante ao reparo, SKALLI et al. (1989) afirmam que o fenótipo mais representativo é o tipo VA, ou seja, células positivas para vimentina e actina alfa de músculo liso, seguido da modalidade VDA, e DA, respectivamente. O anticorpo monoclonal anti-vimentina não exibiu um padrão de marcação característico nas secções em que foi empregado, quando testado em diferentes diluições, e adicionalmente utilizado de acordo com diferentes variações na técnica de imunohistoquímica. Segundo algumas referências bibliográficas indicadas no prospecto do fabricante (DAKO), constatou-se que nas técnicas de imunohistoquímica descritas, todos os autores utilizaram secções à fresco, congeladas em nitrogênio líquido e cortadas no criostato (GAME et al., 1991; OLAH et al., 1992). Em virtude de neste estudo experimental em particular, terem sido utilizadas secções teciduais parafinizadas, este fato representou uma limitação à análise do comportamento fenotípico do miofibroblasto durante o reparo. Todavia, observou-se que as marcações obedeceram a um padrão comum, apresentando grande nível de semelhança para os dois outros anticorpos usados, a saber anti-desmina e anti-actina alfa, não exibindo nenhum grau aparente de supremacia de um, em relação ao outro. Logo, o fenótipo DA foi o que melhor representou a descrição histológica das lâminas utilizadas neste trabalho, embora, paradoxalmente SCHÜRCH et al. (1997) tenham relatado que

os miofibroblastos não exibem marcação desmino-positiva fortemente evidenciada durante o processo de reparo. Adicionalmente, GOWN (1990) hipotetiza que a plasticidade fenotípica do miofibroblasto representa ainda um tema aberto a muitas discussões filosóficas.

O estudo das secções adquiridas a partir das espécimes investigadas neste desenho experimental, revelaram que o miofibroblasto esteve presente de uma maneira mais significativa, a partir da 72^o hora após a indução do ferimento cutâneo, exibindo uma maior representatividade ao longo da evolução do processo cicatricial, até que por volta do 14^o dia, a sua expressão diminuiu consideravelmente. Por outro lado, num estudo experimental adotando o modelo de Selye, FREITAS (1988), intencionando descrever a fibrogênese e a diferenciação das células fusiformes da matrix extracelular durante a formação do tecido de granulação na parede de “bolsões inflamatórios”, observou que os miofibroblastos ainda se constituíam bastante numerosos em animais sacrificados por volta do 30^o dia.

A hipótese de como estas células desaparecem do leito do ferimento foge ao escopo deste estudo, de modo que não foi particularmente considerada. A argumentação mais aceita no âmbito científico é a de que os miofibroblastos, através de suas regulações gênicas, desencadeiam o fenômeno de apoptose, ou então encerram o processo de modulação e retornam ao estado da célula que possivelmente foi a sua progenitora (DESMOULIÈRE et al., 1995).

A possível inter-relação da ação do laser de baixa potência com os miofibroblastos no processo de cicatrização ainda permanece pouco estudada. PORREAU-SCHNEIDER et al. (1990) executaram um estudo *in vivo* a fim de analisar o efeito da irradiação com laser de He-Ne em fibroblastos humanos, e constataram que a energia do laser induziu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Foram obtidas biópsias gengivais, por ocasião da extração do terceiro molar, a fim de examinar o efeito clínico do laser. Depois de 48 horas, os miofibroblastos foram visualizados nas biópsias do tecido tratado com laser, ao passo que no lado contralateral, apenas fibroblastos ativos eram observados. Visando estudar a influência do laser sobre os miofibroblastos *in vivo*, o presente estudo possibilitou uma rigorosa investigação histológica do fenômeno do reparo cutâneo, incluindo a presença dos miofibroblastos no tecido de granulação. O laser não só provocou significativas alterações na matriz conjuntiva, como também estimulou a modulação fibroblástica, sendo que, nos grupos tratados, a presença de miofibroblastos foi acentuadamente marcante. Contudo, o mecanismo pormenorizado pelo qual o laser provocou estes efeitos observados, não se constituiu o objeto desta investigação.

Inúmeros estudos foram conduzidos visando analisar a eficácia da laserterapia na cicatrização (ROCHKIND et al., 1989; in BASFORD et al., 1991). Todavia, alguns parâmetros pertinentes continuamente são objetos de opiniões contraditórias, e a padronização da metodologia utilizada constitui um genuíno desafio. A diversidade de tipos de laser para fins terapêuticos empregados no desenvolvimento dos trabalhos científicos representa a primeira variável a ser considerada. Em adição a este fato, procede a eleição da dosimetria. Baseando-

se em uma grande quantidade de evidências coletadas ao longo do tempo, TUNER & HODE (1999) preconizaram a utilização de 1 a 4 J/cm² de densidade de energia sobre a periferia do ferimento, alegando que doses maiores, poderiam, até mesmo, exercer um efeito inibitório sobre o processo cicatricial.

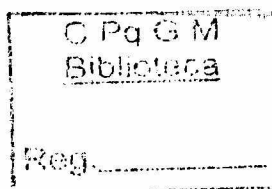
Em virtude do efeito do tratamento com o laser de baixa potência parecer acumulativo, a realização de várias sessões de aplicação tem sido muito defendida e solidamente alicerçada (MESTER et al., 1973). Contudo, algumas contribuições relevantes relataram resultados satisfatórios com o emprego de uma única sessão de aplicação, particularmente quando objetivava-se analisar as alterações primárias que a bioestimulação pode promover a nível tecidual (SILVEIRA et al., 1992; GARCIA et al., 1996). Tendo por alvo objetivo similar, neste estudo experimental, optou-se pela utilização de uma única sessão de aplicação do laser de baixa densidade de energia após o procedimento cirúrgico. Os dados resultantes da análise à microscopia de luz e da microscopia eletrônica, revelaram-se satisfatórios, mesmo instituindo-se aplicação do laser em apenas uma ocasião.

Embora a terapia com o laser de baixa potência tenha sido utilizada por muito tempo no período pós-operatório para o controle da dor e do edema que lhe são inerentes, atualmente há uma tendência crescente para o seu emprego no pré-operatório (TUNER & HODE, 1999). Argumenta-se a favor desta nova modalidade de terapia, em virtude, da capacidade de toda e qualquer irradiação, mesmo em tecidos saudáveis, promover a ativação de vários processos bioquímicos celulares. Porém, visto que o tratamento pós-operatório tem

apresentado dados confiáveis (HARAZAKI et al., 1998; SAITO & SHIMIZU., 1997), optou-se pela sua utilização neste estudo em particular.

As ações bioestimulatórias do laser de baixa potência tem contribuído para a sua aceitação em muitas comunidades científicas. A interferência deste tipo de irradiação na cicatrização e suas possíveis implicações biológicas tem encontrado fervorosos defensores e inquietantes questionadores. No que diz respeito à redução da dor e do edema após o trauma cirúrgico, embora a grande maioria dos estudos atestem os benefícios oriundos da aplicação do laser (VEÇOSO, 1993; OSAWA et al., 1997), outros, afirmam que não foi observada nenhuma alteração digna de nota (NICOLLI-FILHO et al., 1993; ALLENDORF et al., 1997). Mais uma vez, comprova-se o desafio de se instituir uma rigorosa padronização da técnica utilizada, podendo-se atribuir esta justificativa a estes aparentes dados contraditórios. Embora este estudo em particular fosse eminentemente descritivo, destituindo-se assim de qualquer especulação quantitativa, procurou-se adotar uma metodologia que atendesse ao rigor científico, com especial atenção aos viés de seleção e observação, sendo que toda a análise histopatológica e ultraestrutural foi executada sem o conhecimento prévio dos grupos estudados.

Entre os muitos efeitos biológicos induzidos pela aplicação do laser de baixa potência nos tecidos, destaca-se a vasodilatação. Tem-se sugerido que este efeito não é decorrente apenas da ação direta da luz laser sobre os receptores celulares, mas também do estímulo à liberação de metabólitos celulares vasodilatadores e/ou mediadores vasculares humorais, entre os quais destacam-se aqueles provenientes dos mastócitos (TÜNER & HODE, 1999). Os



mastócitos são células secretoras especializadas, que em seu estado funcional de “repouso”, contém uma infinidade de grânulos circundados por uma membrana. Além da histamina, outras substâncias secretórias biologicamente ativas, tais como glucoronidase, fosfatases ácidas, proteases, fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilos podem ser encontrados em seus grânulos de secreção.

No estudo histológico das secções teciduais no presente experimento, pôde-se verificar a presença de muitos mastócitos exibindo o fenômeno de desgranulação. Estas células apresentavam-se distribuídas nas camadas mais profundas da derme e amíude, encontravam-se dispostas nas adjacências de pequenos capilares sangüíneos. Constatou-se que a degranulação era marcadamente mais evidente no grupo tratado com laser, principalmente naquele que recebeu a dosimetria de 4 J/cm². SILVEIRA et al. (1991) desenvolveram um estudo experimental em *Cavia Porcellus* para avaliar o efeito da laserterapia no comportamento dos mastócitos oriundos da derme. Tendo em mente este objetivo, utilizaram um laser do tipo Ga-As com 904 nm, em uma única sessão de aplicação, sendo esta realizada pontualmente e com duração de 5 minutos em úlceras padronizadas no dorso das espécimes. Após o uso do laser, os animais foram sacrificados progressivamente em horas sucessivas, a saber, 0, 4, 8, 24, 72, 120, 144 e 168 horas. A fim de possibilitar uma melhor visualização da degranulação mastocitária, algumas secções foram coradas com azul de toluidina. Para a análise dos demais fenômenos que permeiam o processo cicatricial, utilizou-se a coloração rotineira à base de hematoxilina-eosina. De posse de resultados quantitativos, os autores concluíram que a irradiação laser de baixa magnitude sobre a pele do dorso das cobaias, envolvendo epitélio e

conjuntivo subepitelial, induziu um número significativo de mastócitos a degranular, ao passo que nas secções controle, a representatividade numérica de mastócitos em degranulação era bem menos expressiva. Estes achados foram adicionalmente confirmados por SAYED et al. (1990), os quais testaram a ação da irradiação laser utilizando diferentes diodos semicondutores. Como o estudo experimental desenvolvido no presente momento caracterizou-se por uma abordagem descritiva, avaliando qualitativamente as alterações teciduais mais marcantes, não foi possível realizar a análise da significância estatística dos mastócitos em desgranulação, embora ficasse bastante óbvio, a sua presença nos tecidos estudados.

Com relação à presença de fibras colágenas, alguns estudos confirmam que o laser tem a capacidade de estimular a proliferação fibroblástica e induzir tais células à produção de grandes quantidades dessas fibras (SKINNER et al., 1996). Este dado corrobora o presente estudo experimental, uma vez que, observou-se que os grupos tratados apresentaram uma maior expressão de fibras colágenas, principalmente por volta do 5^o dia após a realização do ferimento. Todavia, estes resultados não foram semelhantes no que diz respeito às fibras elásticas coradas pela orceína, pois todos os grupos exibiam características semelhantes ao longo do processo cicatricial.

Um outro elo central na evolução do reparo tecidual é a angiogênese. Ela representa um processo pelo qual as células endoteliais, através da secreção de proteases, degradam a matriz extracelular e migram nos espaços perivasculares, proliferando e se reorganizando para formar novos vasos. Este processo biológico

é finamente regulado pela ação coordenada de uma série de citocinas, tais como, o FGF, PDGF e TGF- β , entre muitas outras. Segundo ANDRADE (1999), os novos capilares, à medida que crescem e se dirigem para a superfície da lesão, exibem um aspecto arqueado, conferindo um aspecto granuloso avermelhado à superfície, daí se originando a denominação "tecido de granulação". As suas paredes são muito permeáveis e permitem a livre passagem de líquido e proteínas para o meio extracelular, sangrando facilmente ao menor trauma e conferindo ao tecido de granulação um aspecto edemaciado. A hipótese de que a terapia laser pudesse incrementar a circulação sanguínea foi testada em um estudo randomizado desenvolvido por SCHINDL et al. (1998), os quais analisaram a cicatrização de úlceras e/ou gangrenas de pacientes diabéticos, após uma única aplicação pontual com um laser tipo He-Ne. Um grupo de pacientes foi tratado com laser, ao passo que o segundo, recebeu tratamento com placebo. O incremento da circulação sanguínea no local afetado, foi mensurado através do emprego de termografia infra-vermelha. A análise estatística revelou um significativo aumento da temperatura da pele após a irradiação com laser, em detrimento ao grupo que recebeu o placebo. Em 1999, os mesmos autores relataram um caso clínico de um paciente com uma úlcera na região cervical, adquirida ao longo de tratamento com radiação ionizante, o qual foi submetido à laserterapia. As biópsias obtidas a partir da margem e centro da úlcera cicatrizada, depois da terapia laser, revelaram um significativo aumento no número de vasos dérmicos em relação ao estado anterior à aplicação do laser.

Como a actina alfa de músculo liso pode ser encontrada em células mioepiteliais e musculares lisas, o estudo imunohistoquímico viabilizou a

avaliação da angiogênese nos diferentes grupos utilizados neste desenho experimental. Adicionalmente, mediante a utilização da coloração com orceína, pôde-se visualizar a lâmina elástica externa de pequenas arteríolas presentes no tecido de granulação. Desta forma atestou-se que a angiogênese foi mais acentuada nos grupos tratados, em detrimento ao controle, sendo ainda mais expressiva no subgrupo que recebeu 4 J/cm^2 de densidade de energia, confirmando os dados dos estudos supracitados.

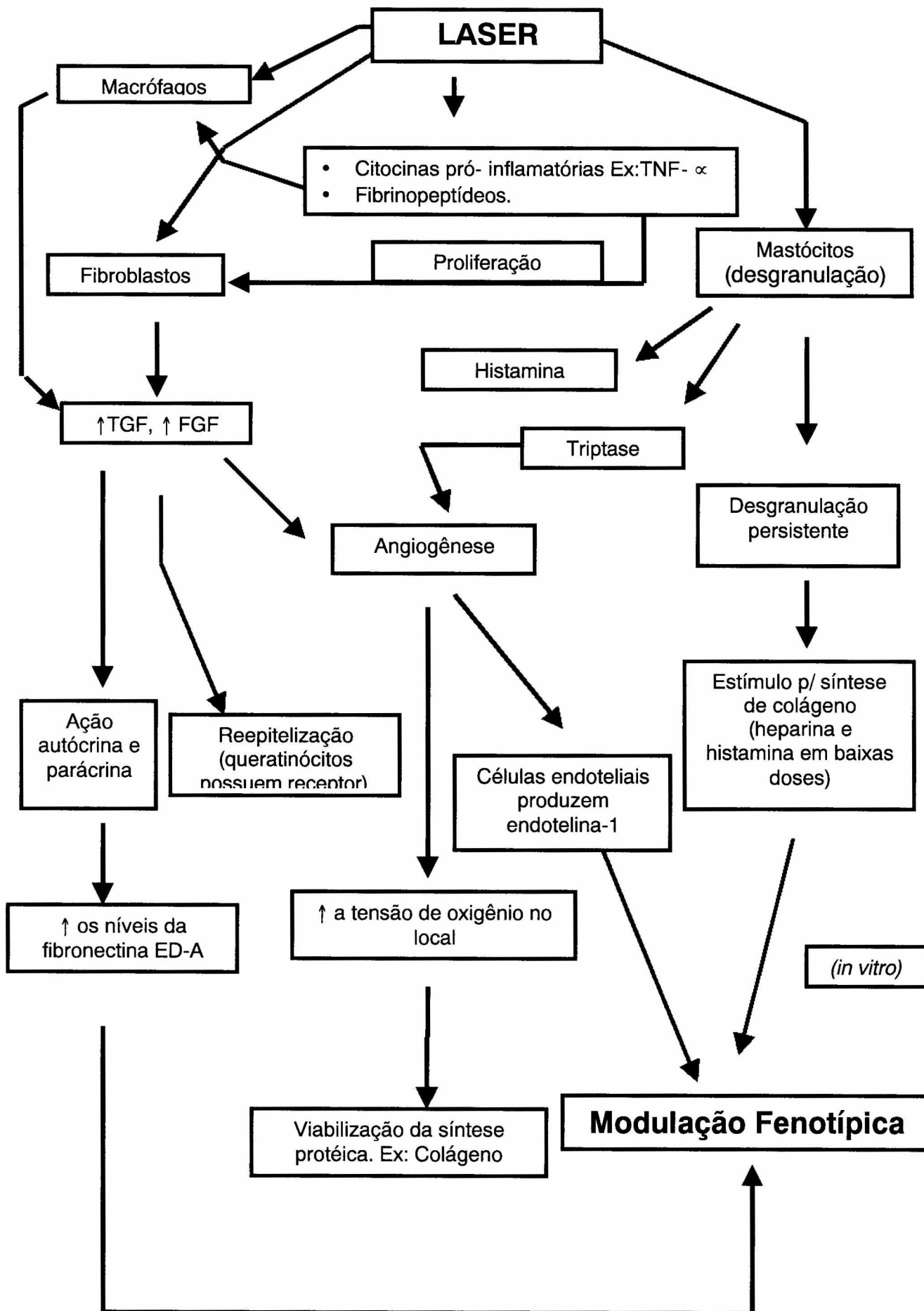
O recobrimento da ferida cutânea é obtido precocemente mediante o movimento lateral de queratinócitos basais e suprabasais, sob a ação estimulatória de algumas citocinas específicas e metaloproteinases presentes na matriz extracelular. O número de mitoses é bastante acentuado e altamente coordenado do ponto de vista espacial e temporal. A partir do momento em que estas células se separam da membrana basal e migram pelo leito do ferimento, elas interagem com uma série de moléculas, tais como fibrina, fibronectina, vitronectina, tenascina e colágenos, as quais diferem grandemente daquelas que compõem usualmente a sua membrana basal (AGREN, 1999). De acordo com KIBE et al. (2000), uma das citocinas que exerce uma influência marcante no processo cicatricial é o FGF, produzido essencialmente pelos macrófagos. Através da realização de estudos imunohistoquímicos das secções obtidas a partir de tecido cutâneo de ratos, nos quais foi induzida experimentalmente uma queimadura de 3^o grau, os autores constataram que a marcação com um anticorpo policlonal anti-FGF revelou-se mais pronunciada em quatro localizações principais, a saber, na epiderme regenerada, em uma faixa contínua próxima à epiderme regenerada, nos capilares neformados e nas células que proliferavam

em meio ao tecido de granulação. Resultados semelhantes foram obtidos por HAAS et al. (1990), os quais utilizaram culturas de queratinócitos humanos submetidos à ação da luz laser do tipo He-Ne, verificando que a irradiação estimulou a migração destas células *in vitro*. No estudo que é objeto de análise nesta dissertação, observou-se que o fenômeno de reepitelização tornou-se manifesto primariamente nos grupos tratados com o laser, em detrimento ao controle. Todavia, no ponto de sacrifício representado pelo 7^o dia, as secções teciduais revelaram que no grupo controle, a reepitelização já se encontrava mais acelerada em comparação ao grupo submetido à laserterapia. Uma possível explicação para este evento envolve a argumentação de que o laser pode desempenhar um papel mais eficaz no processo cicatricial, quando são administradas doses terapêuticas adicionais em dias consecutivos. Todavia, este estudo confirmou os benefícios oriundos de uma única sessão de aplicação, apresentando consideráveis ganhos iniciais, principalmente no que diz respeito à redução do edema, desgranulação de mastócitos e expressão precoce de células apresentando um fenótipo de miofibroblastos em um tecido de granulação mais exuberante.

Influenciando o curso das alterações que integram a fase inflamatória inicial do processo de cicatrização, tais como geração de calor, eritema, edema e dor, muitos autores tem relatado a ação benéfica e bioestimulante do laser de baixa potência (AUN et al., 1989; SILVEIRA et al., 1992; HARAZAKY et al., 1998). Além desta finalidade terapêutica, esta fototerapia também tem sido utilizada, com êxito, no tratamento de distúrbios patológicos sistêmicos e locais (LIZARELLI, 1997; PALMGREN et al., 1989).

Com base neste estudo descritivo, ora realizado, várias hipóteses puderam ser formuladas, na tentativa de sugerir os possíveis mecanismos, pelos quais o laser pode contribuir para a melhoria da cicatrização. O organograma disposto na página 68, ilustra algumas possíveis explicações para este fenômeno.

Contudo, apesar da existência de um vasto acervo científico que corrobora os resultados apresentados neste estudo, urge a crescente necessidade de padronização da metodologia empregada. Este, indubitavelmente, é o verdadeiro desafio da laserterapia, e a sua consecução possibilitará o acesso a informações menos conflitantes, embora a análise crítica se constitua o cerne do pensamento científico.



8 CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos neste estudo, pode-se concluir que:

- 1) Os efeitos primários da laserterapia provocaram uma aceleração do processo de cicatrização, a qual se tornou mais evidente a partir da 72^o hora após a indução do ferimento cutâneo. Contudo, por volta do 14^o dia, todos os grupos apresentavam características macroscópicas semelhantes.
- 2) As evidências imunohistoquímicas, adicionalmente confirmadas pelos achados ultraestruturais, demonstraram que a expressão de miofibroblastos foi mais acentuada naqueles animais que receberam o tratamento pós cirúrgico com o laser de baixa densidade de potência.
- 3) O laser contribuiu para a redução do edema pós-operatório.
- 4) Embora, não tenha sido realizada coloração metacromática para o estudo específico dos mastócitos, observou-se nos grupos tratados com laser, maior expressão destes elementos celulares e desgranulação dos mesmos, em comparação aos animais controle.
- 5) Houve uma maior expressão de fibras colágenas, por volta do 5^o e 7^o dias após a realização dos ferimentos cutâneos padronizados, nos animais irradiados, embora não se constatasse diferenças

estatisticamente significativas. Todavia, por volta do 14^o dia, as diferenças não eram tão acentuadas, de modo que, todos os grupos exibiam um tecido fibroso cicatricial similar.

- 6) Constatou-se que os efeitos benéficos primários da irradiação com 4 J/cm² de densidade de energia sempre foram superiores àqueles observados no grupo de animais que recebeu uma dose total de 8 J/cm².

9 PRANCHAS

Prancha 01

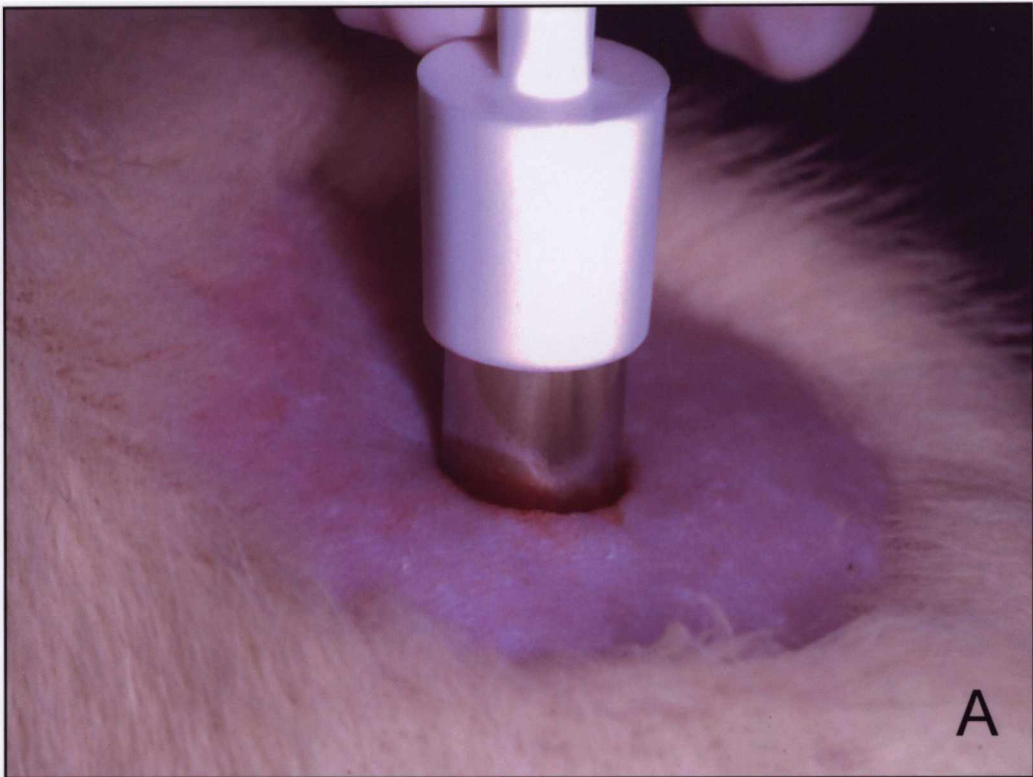
Figura A

Aspecto macroscópico no momento da realização do ferimento cutâneo na região dorsal do animal com o bisturi circular.

Figura B

Aspecto macroscópico inicial do ferimento produzido em pele de rato.

Prancha 01



Prancha 02

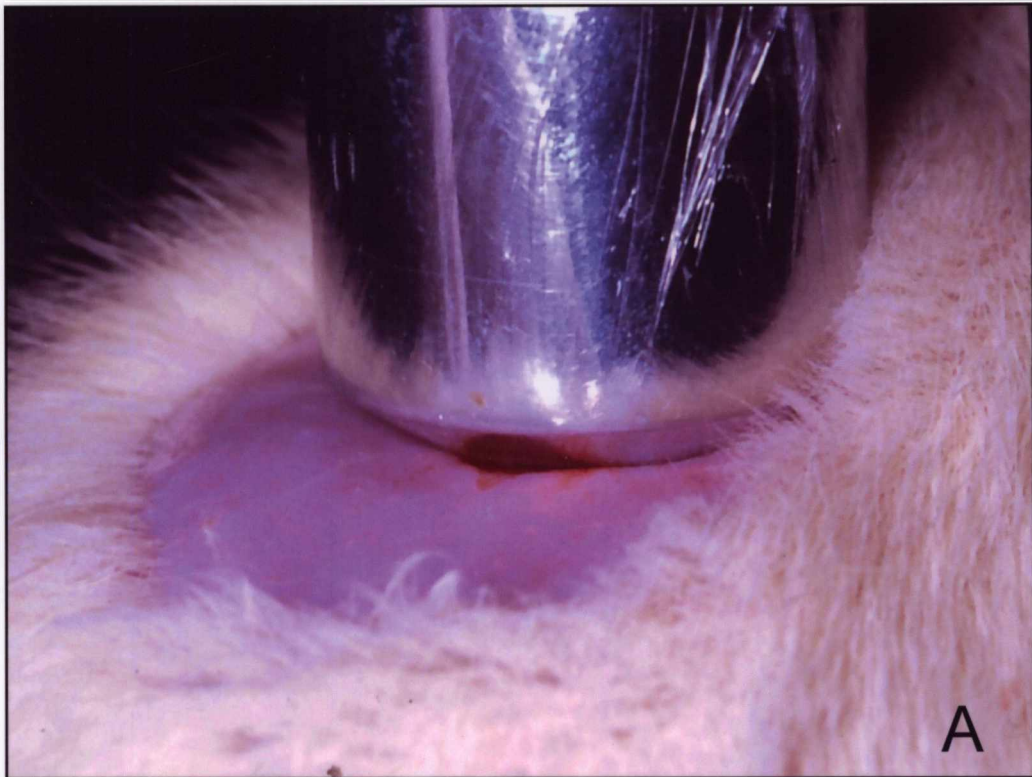
Figura A

Aplicação pontual do raio laser no ferimento cutâneo, encostando-se a ponta ativa do aparelho sobre a área.

Figura B

Aspecto frontal do aparelho de laser do tipo Ga-As-Al, utilizado no experimento.

Prancha 02



A



B

Prancha 03

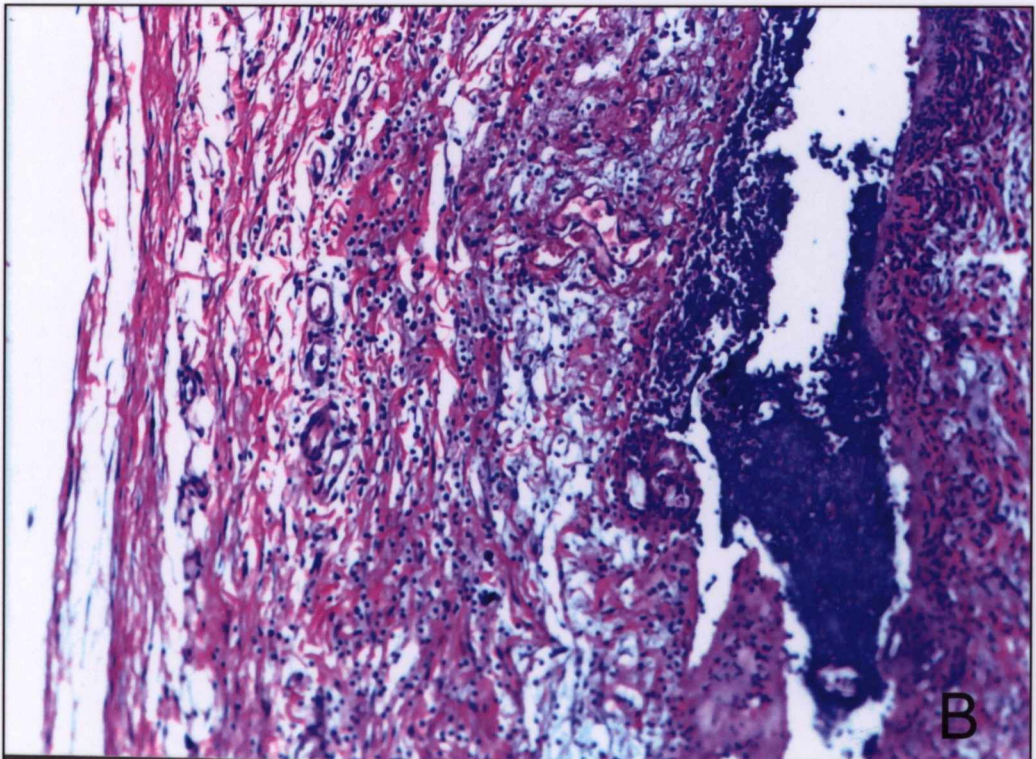
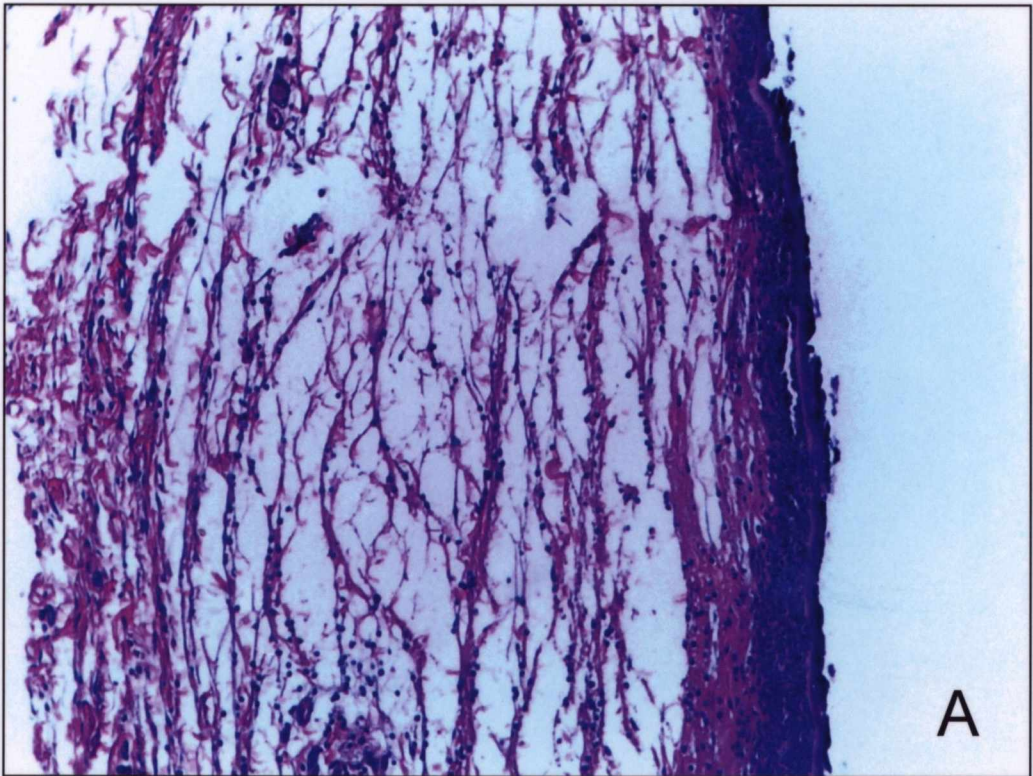
Figura A

Presença de infiltrado inflamatório agudo, edema e congestão vascular intensos em animal controle, sacrificado 24 horas após o procedimento cirúrgico. Hematoxilina-eosina. 100 X.

Figura B

Presença de infiltrado inflamatório agudo, edema e congestão vascular moderados em animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 24 horas após o procedimento cirúrgico. Hematoxilina-eosina. 100 X.

Prancha 03



Prancha 04

Figura A

Presença de infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear em animal controle, sacrificado 48 horas após a realização do ferimento cutâneo. Hematoxilina-eosina. 400 X.

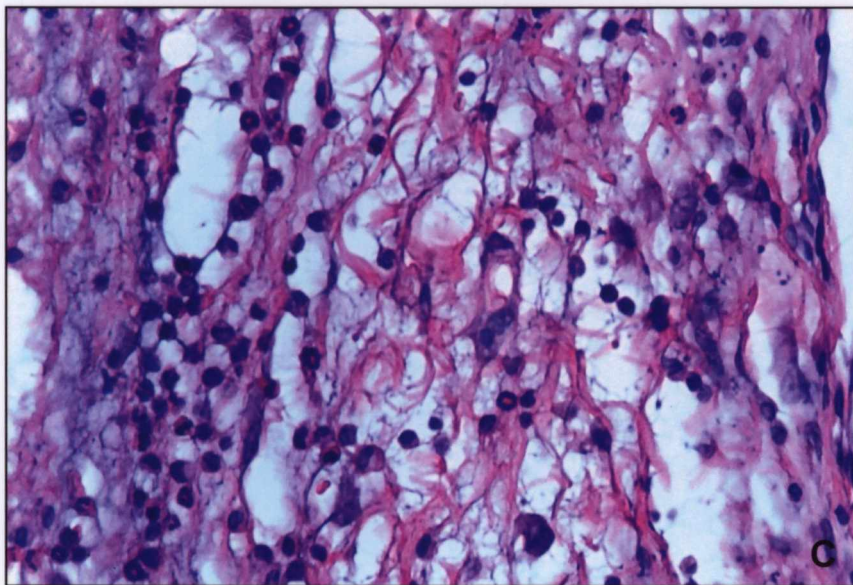
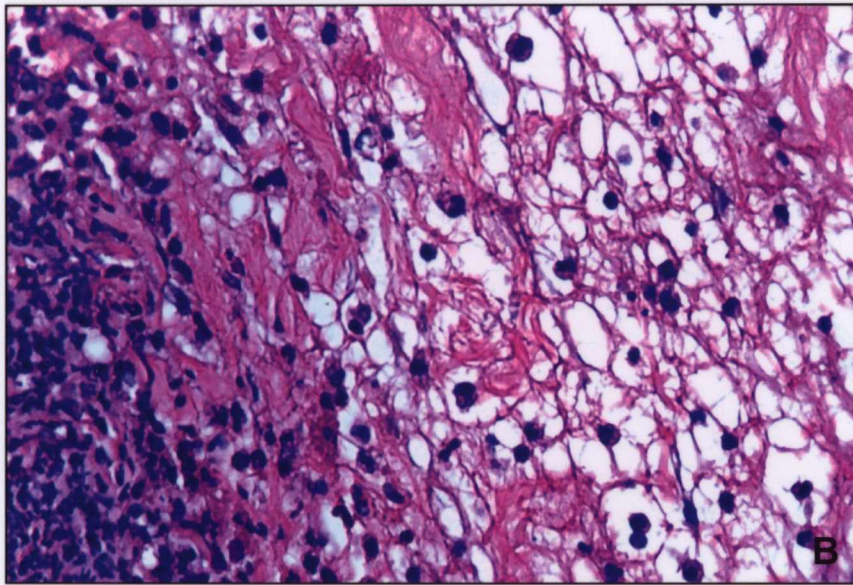
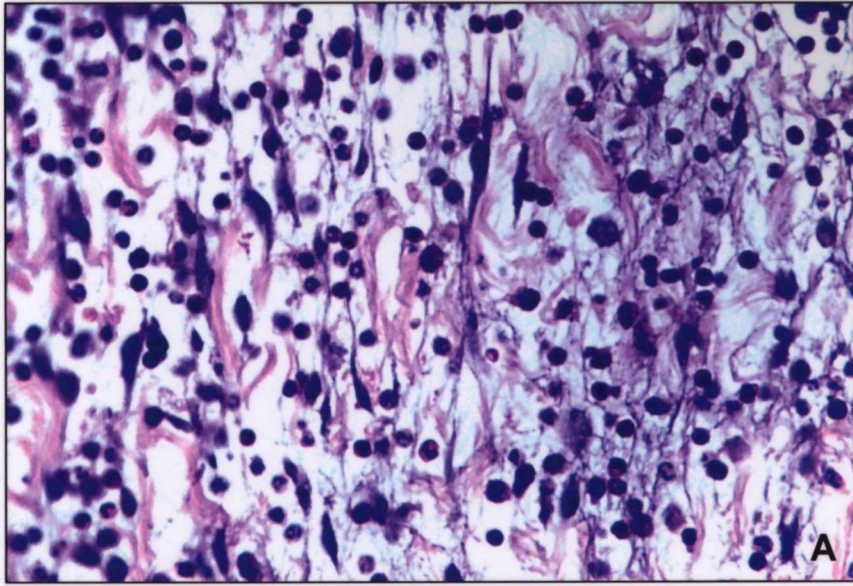
Figura B

Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear em animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 48 horas após a cirurgia cutânea. Hematoxilina-eosina. 400 X.

Figura C

Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear em animal tratado com 8 J/cm², e sacrificado 48 horas após a cirurgia cutânea. Hematoxilina-eosina. 400 X.

Prancha 04



Prancha 05

Figura A

Presença de fibras colágenas esparsas na derme de animal controle, sacrificado 48 horas após o procedimento cirúrgico. Sírius vermelho. 100 X.

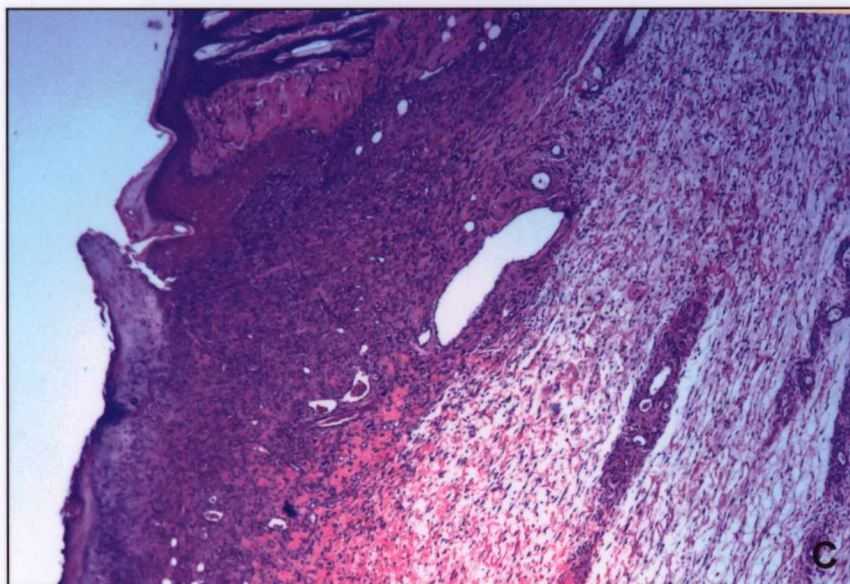
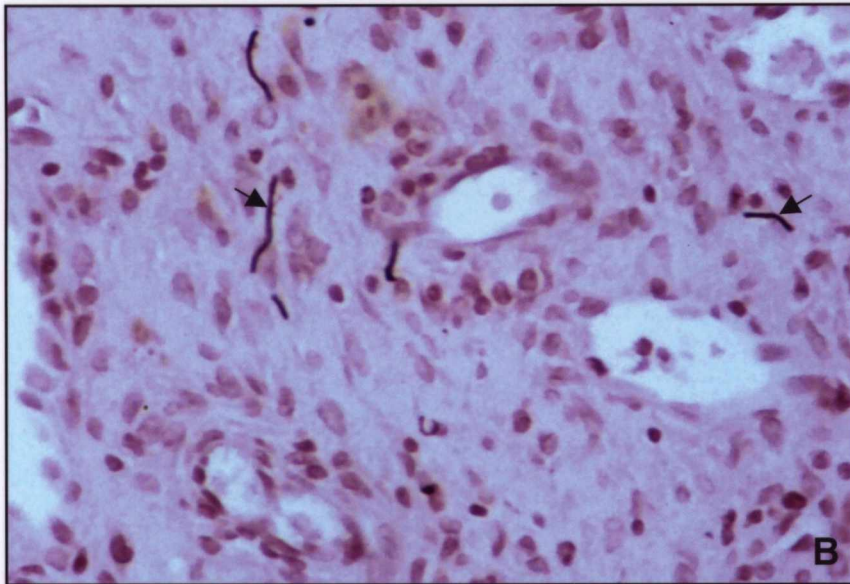
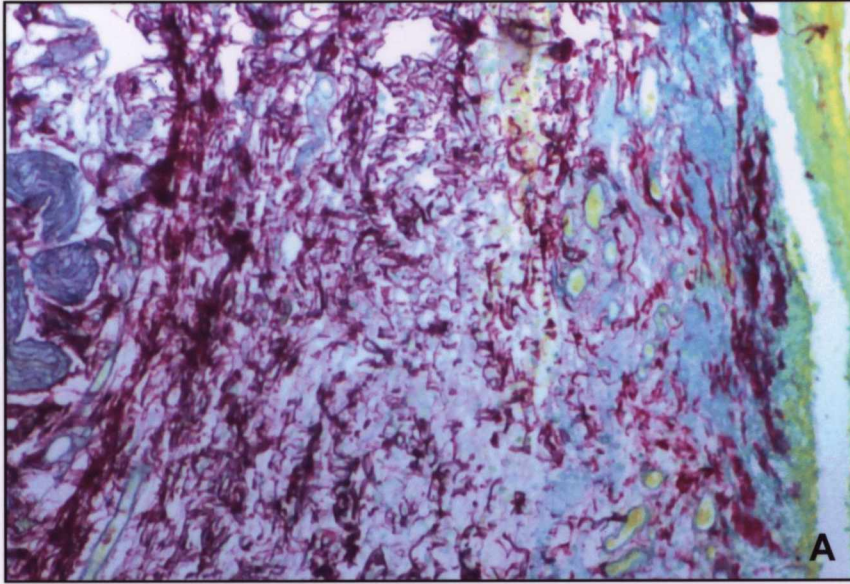
Figura B

Distribuição ocasional de fibras elásticas (setas) na área do ferimento em animal tratado com 8 J/cm², e sacrificado com 48 horas. Orceína de Weigert. 400 X.

Figura C

Presença de infiltrado inflamatório e edema moderados, abaixo da área do tecido de granulação em animal controle, sacrificado 72 horas após a cirurgia cutânea. Hematoxilina-eosina. 40X.

Prancha 05



Prancha 06

Figura A

Presença de mastócitos com diferentes densidades de grânulos citoplasmáticos dispersos em meio ao infiltrado inflamatório (setas), em animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado com 72 horas. Hematoxilina-eosina. 400 X.

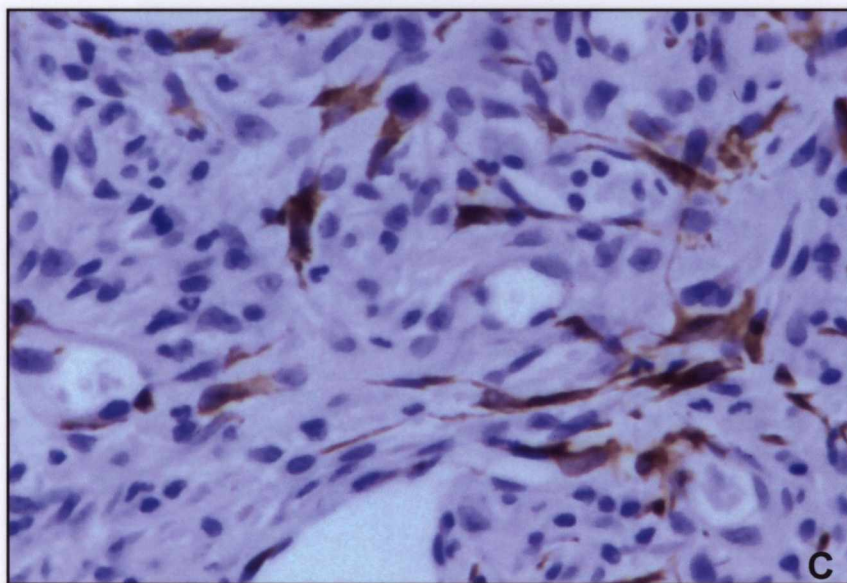
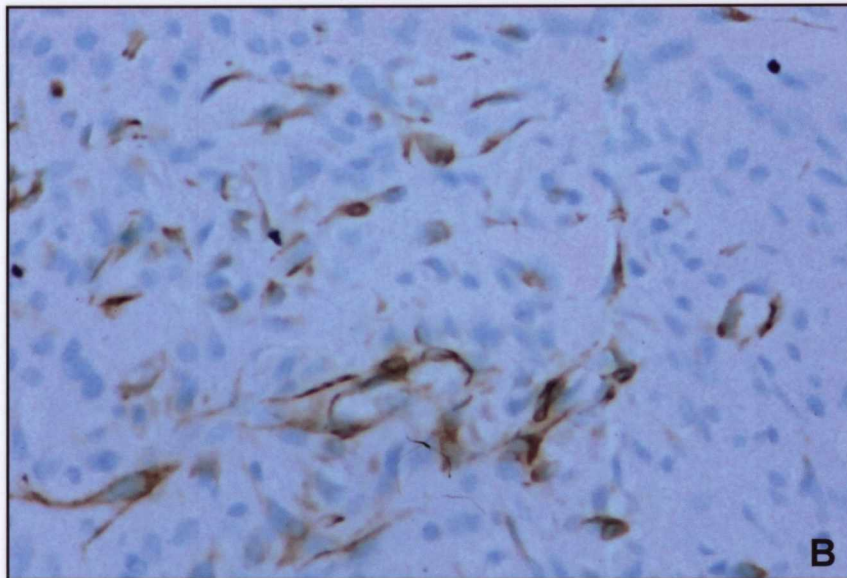
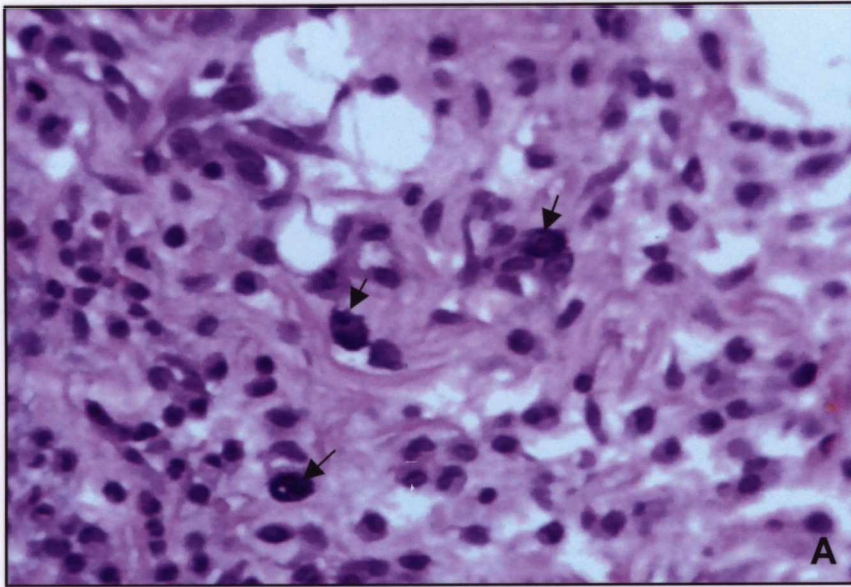
Figura B

Expressão de células desmino-positivas na área do ferimento em animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-desmina. Streptavidina-biotina. 400 X.

Figura C

Expressão de células actino-positivas no tecido de granulação de um animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-actina alfa de músculo liso. Streptavidina-biotina. 400 X.

Prancha 06



Prancha 07

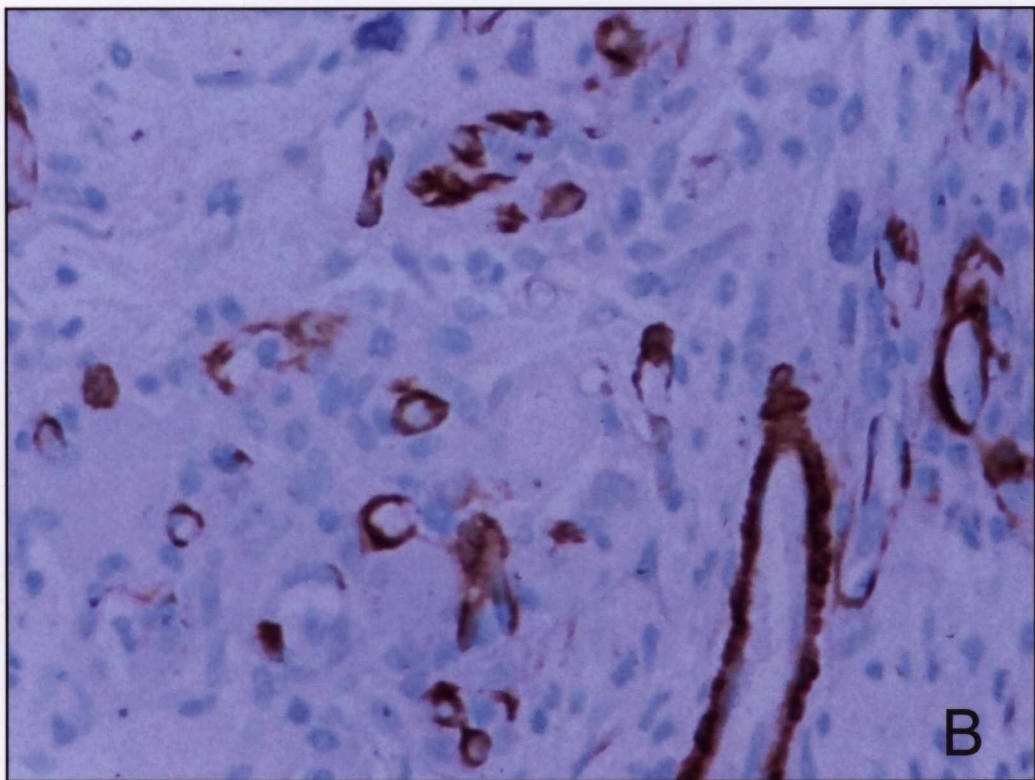
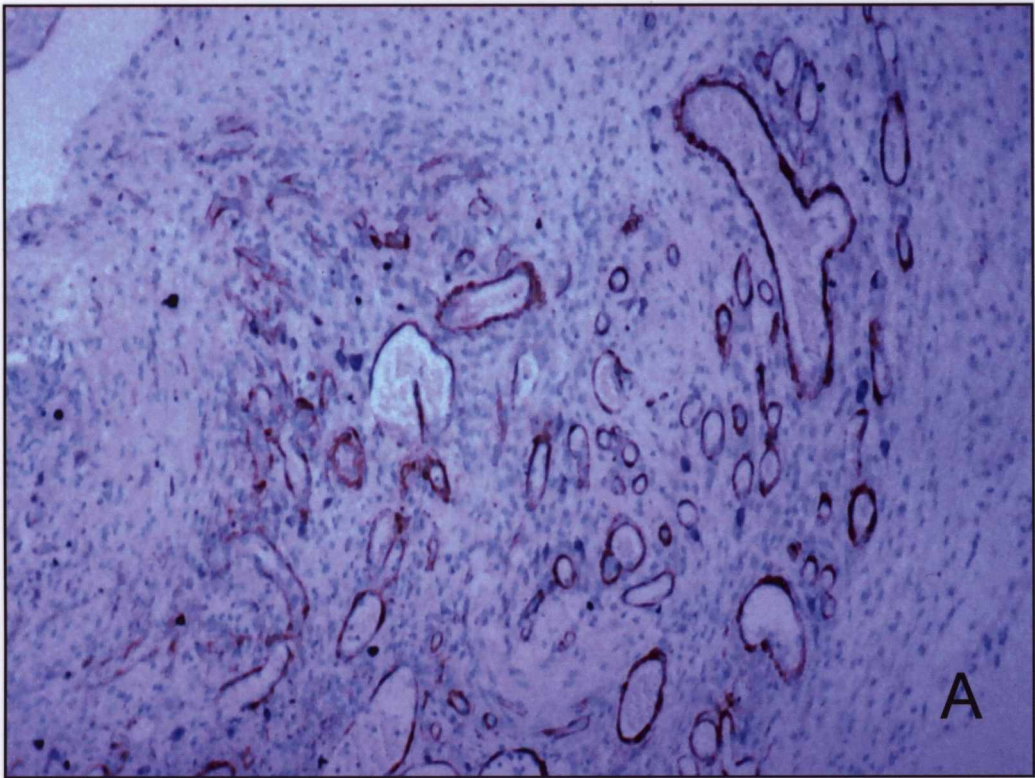
Figura A

Expressão de células actino-positivas nos vasos sangüíneos e em células esparsas, de um animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-actina alfa de músculo liso. Streptavidina-biotina. 100 X.

Figura B

Expressão de células actino-positivas nas adjacências de vasos sangüíneos, os quais aparecem com a sua camada muscular fortemente positiva para actina, em um animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-actina alfa de músculo liso. Streptavidina-biotina. 400 X.

Prancha 07



Prancha 08

Figura A

Tecido de granulação, exibindo grande expressão de células fusiformes e neoformação vascular em animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 5 dias após a cirurgia cutânea. Hematoxilina-eosina. 400 X.

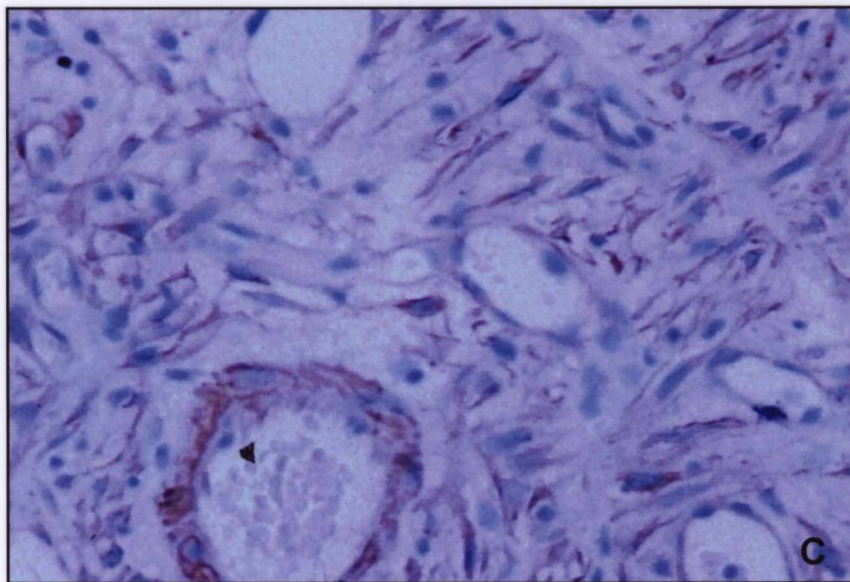
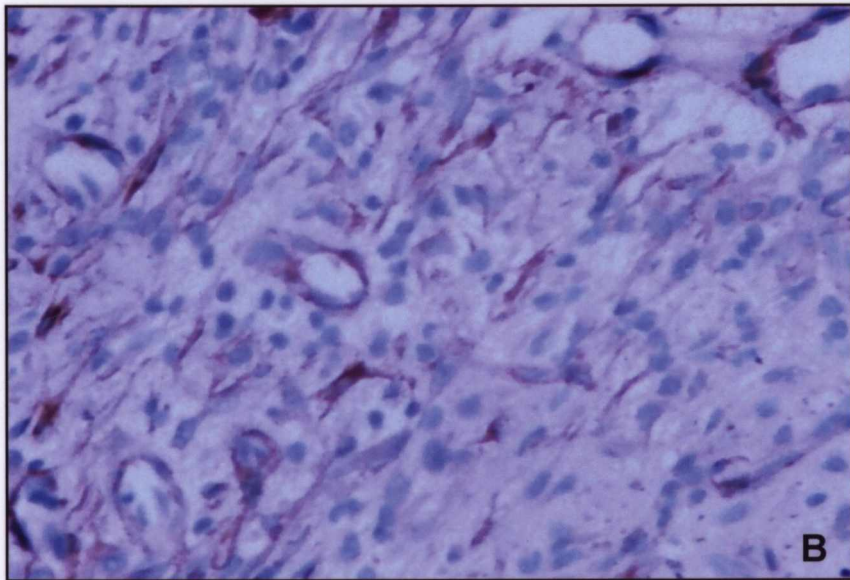
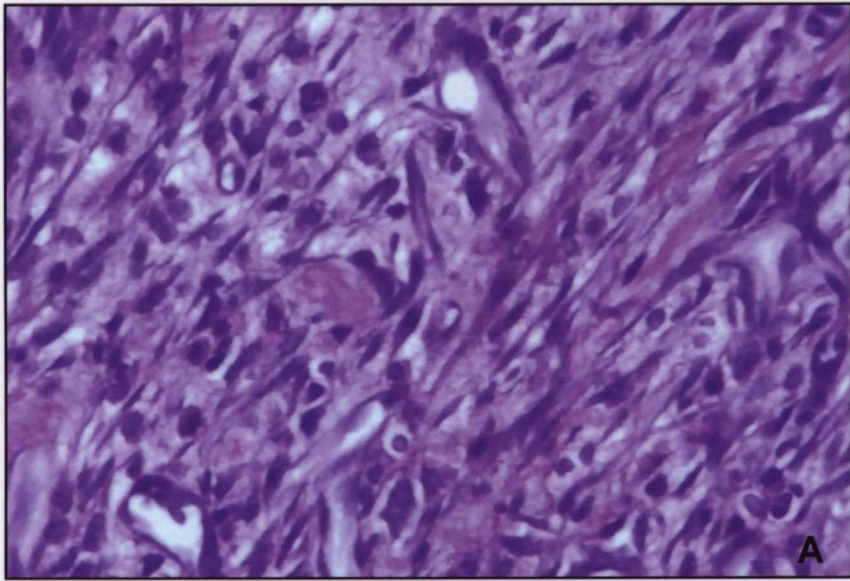
Figura B

Expressão de células desmino-positivas no tecido de granulação de um animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 5 dias após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-desmina. Streptavidina-biotina. 400 X.

Figura C

Expressão de células actino-positivas e de vasos sanguíneos igualmente positivos em um animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 5 dias após o procedimento cirúrgico. Anticorpo anti-actina alfa de músculo liso. Streptavidina-biotina. 400 X.

Prancha 08



Prancha 09

Figura A

Expressão de fibras colágenas, que aparecem fortemente coradas em vermelho, na matriz extracelular de um animal controle, sacrificado 7 dias após a cirurgia. Sírius vermelho. 100 X.

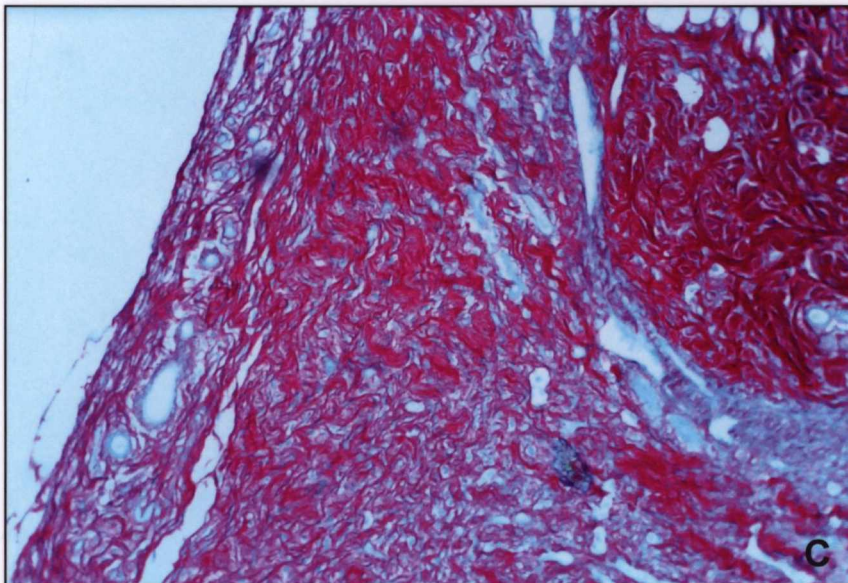
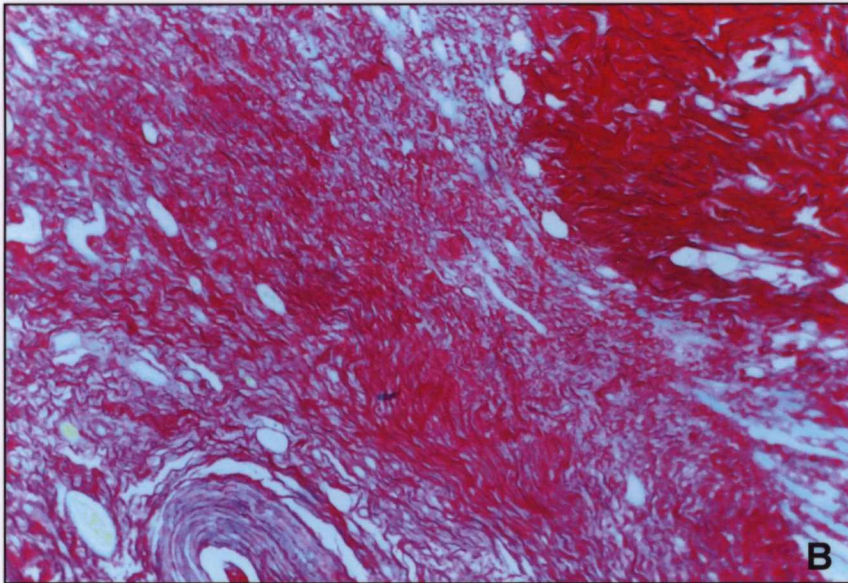
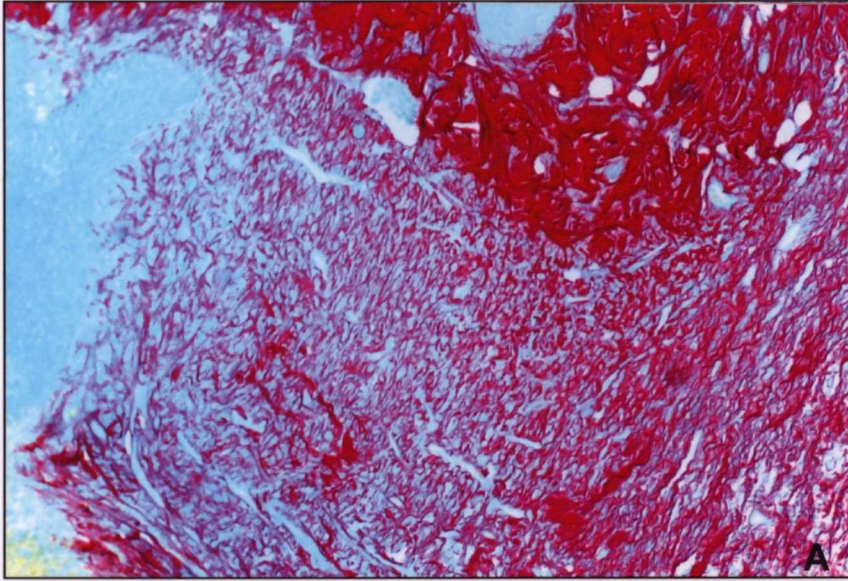
Figura B

Expressão de fibras colágenas de um animal tratado com 4 J/cm², e sacrificado 7 dias após a cirurgia. Sírius vermelho. 100 X.

Figura C

Expressão de fibras colágenas de um animal tratado com 8 J/cm², e sacrificado 7 dias após a cirurgia. Sírius vermelho. 100 X.

Prancha 09

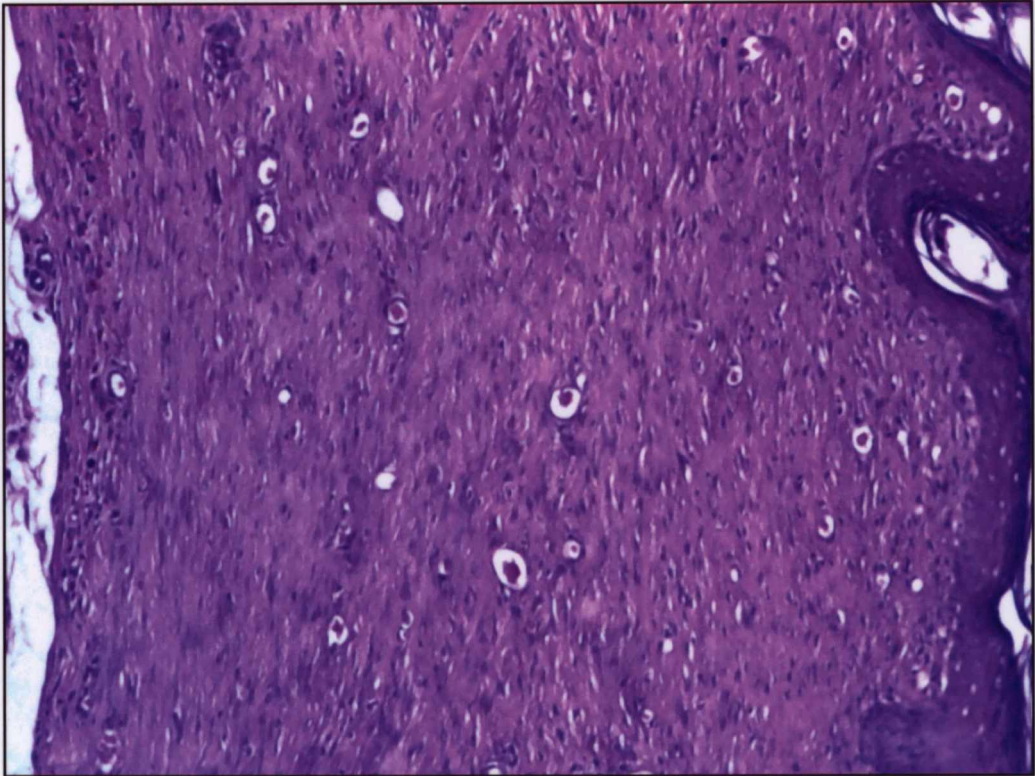


Prancha 10

Figura A

Tecido fibroso cicatricial, destituído de anexos cutâneos, apresentando matriz extracelular rica em colágeno imaturo e células fusiformes, em animal controle sacrificado com 14 dias. Hematoxilina-eosina. 100 X

Prancha 10



Prancha 11

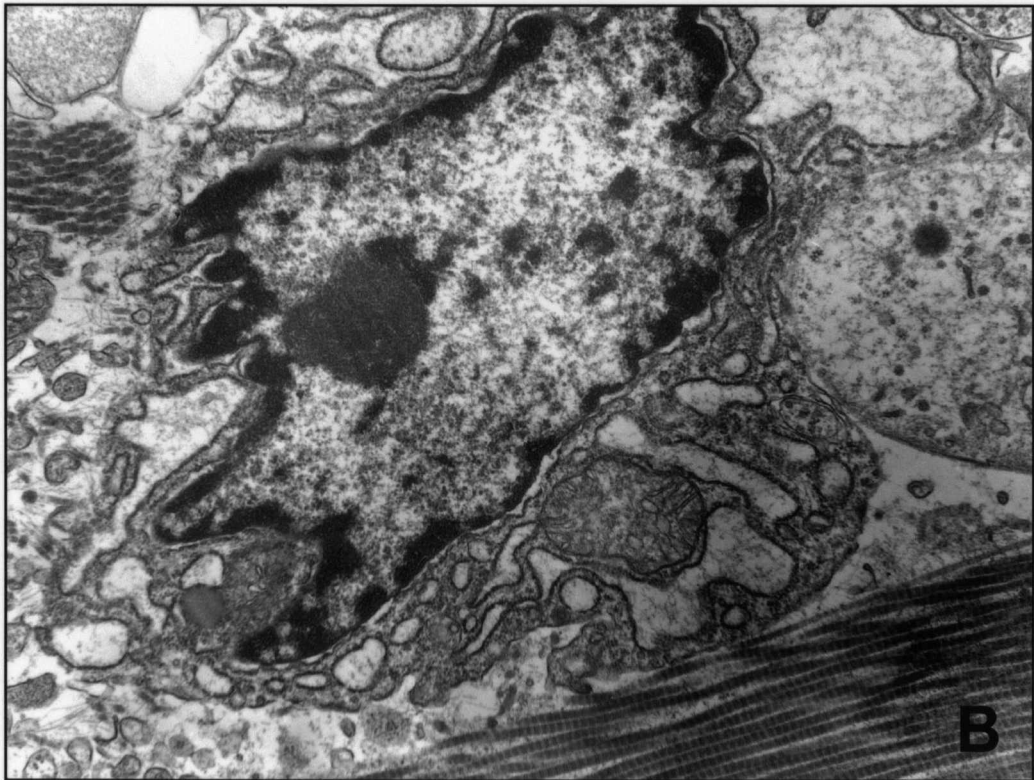
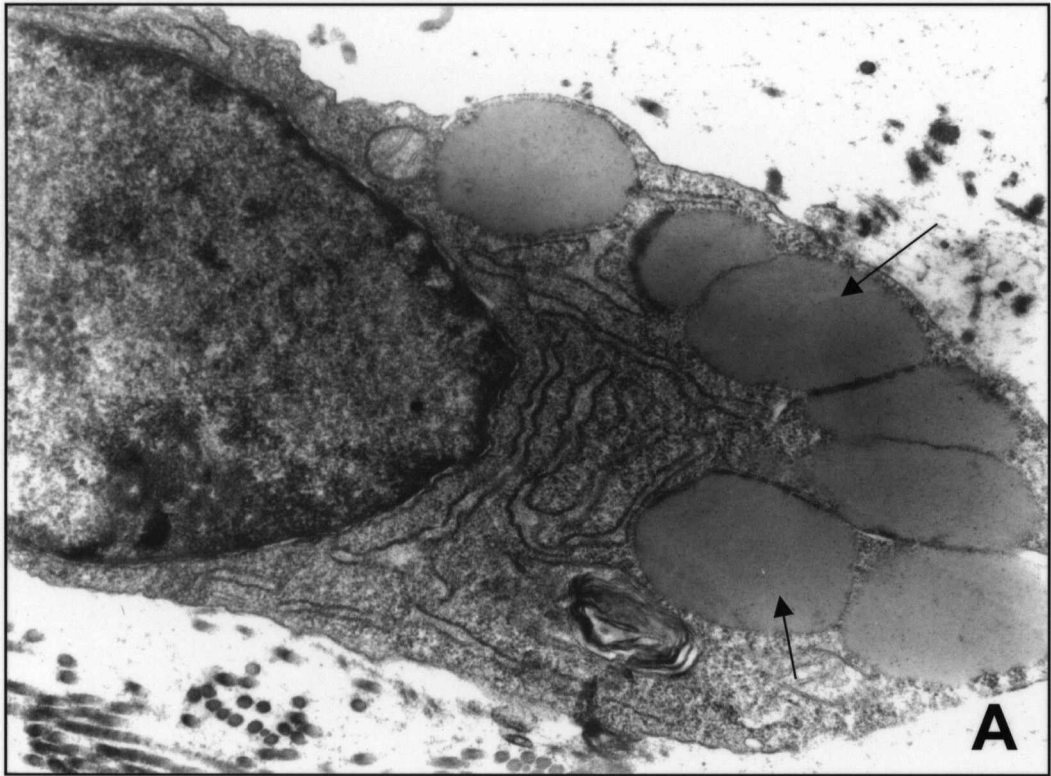
Figura A

Fibroblasto apresentando vacúolos de gordura no interior do citoplasma (setas) e rico retículo endoplasmático rugoso. Animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 12000 X.

Figura B

Fibroblasto em intensa atividade de síntese, exibindo rico retículo endoplasmático rugoso e fibras colágenas nas suas proximidades. Animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 7000 X.

Prancha 11



Prancha 12

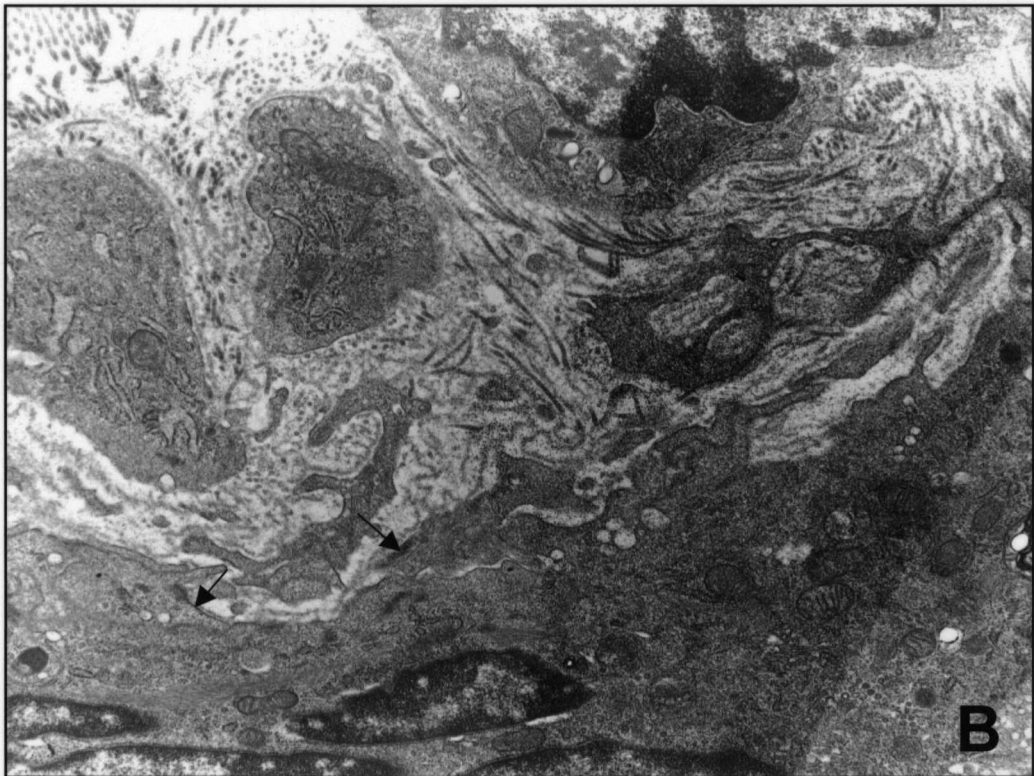
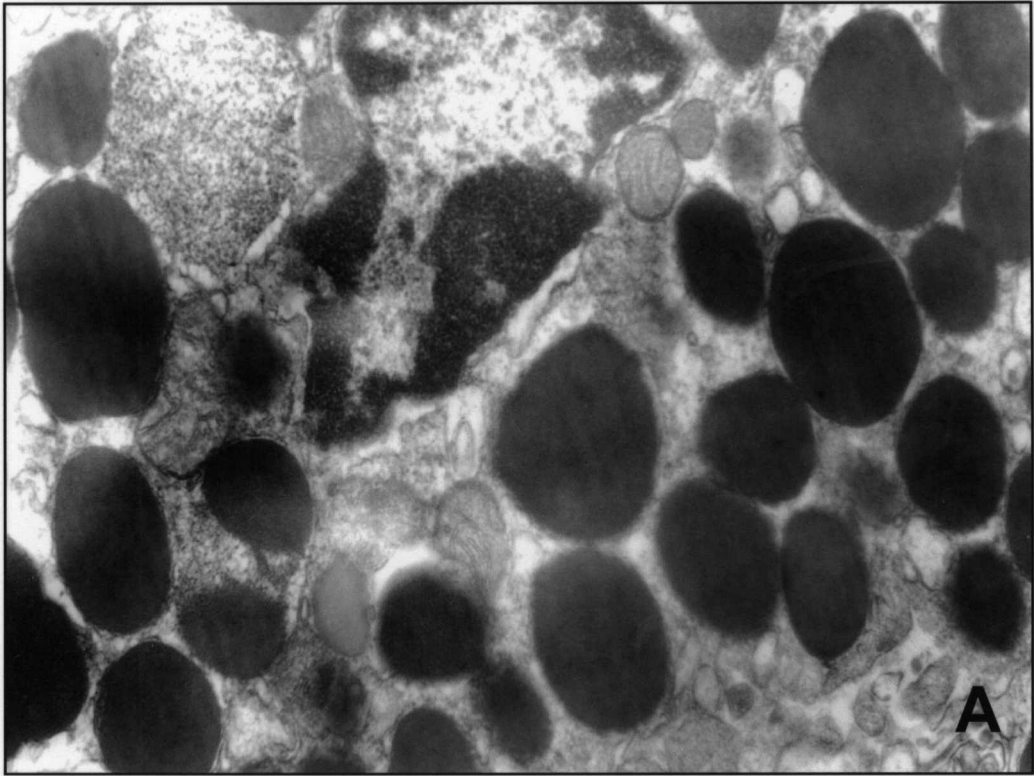
Figura A

Grânulos dos mastócitos . Animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 72 horas após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 12000 X.

Figura B

Miofibroblasto associado a fibroblastos apresentando reforços membranares (setas) e um material perimembranar semelhante a membrana basal. O colágeno presente na matriz extracelular ainda exibe evidências de desorganização. Animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 5 dias após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 4400 X.

Prancha 12



Prancha 13

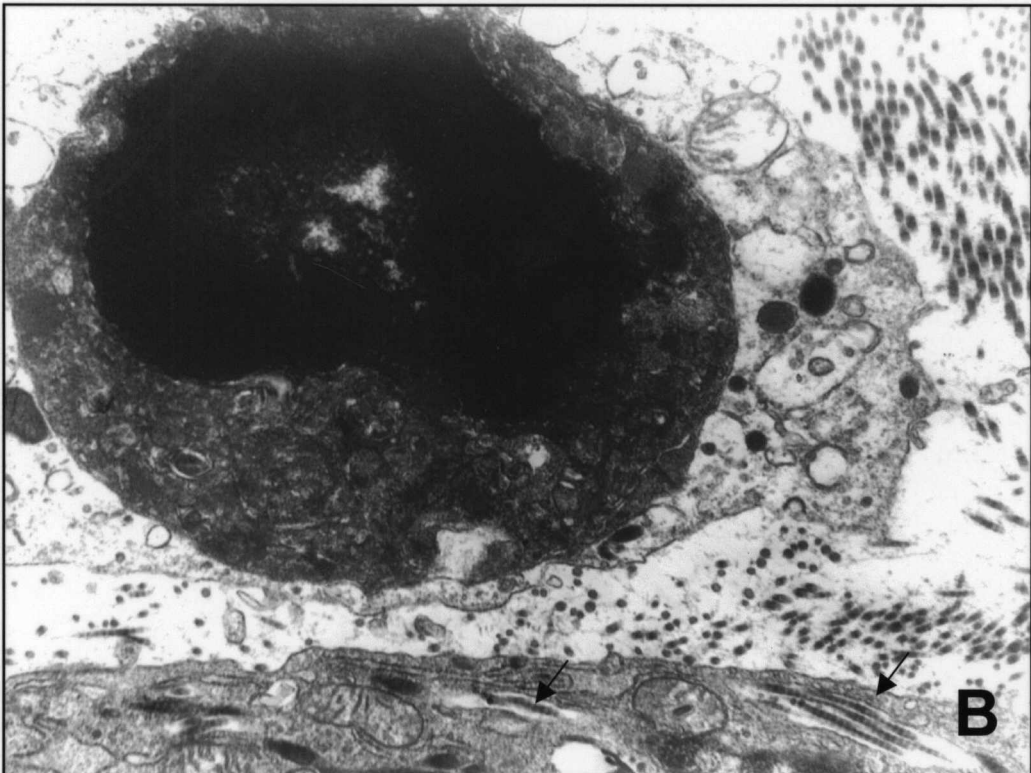
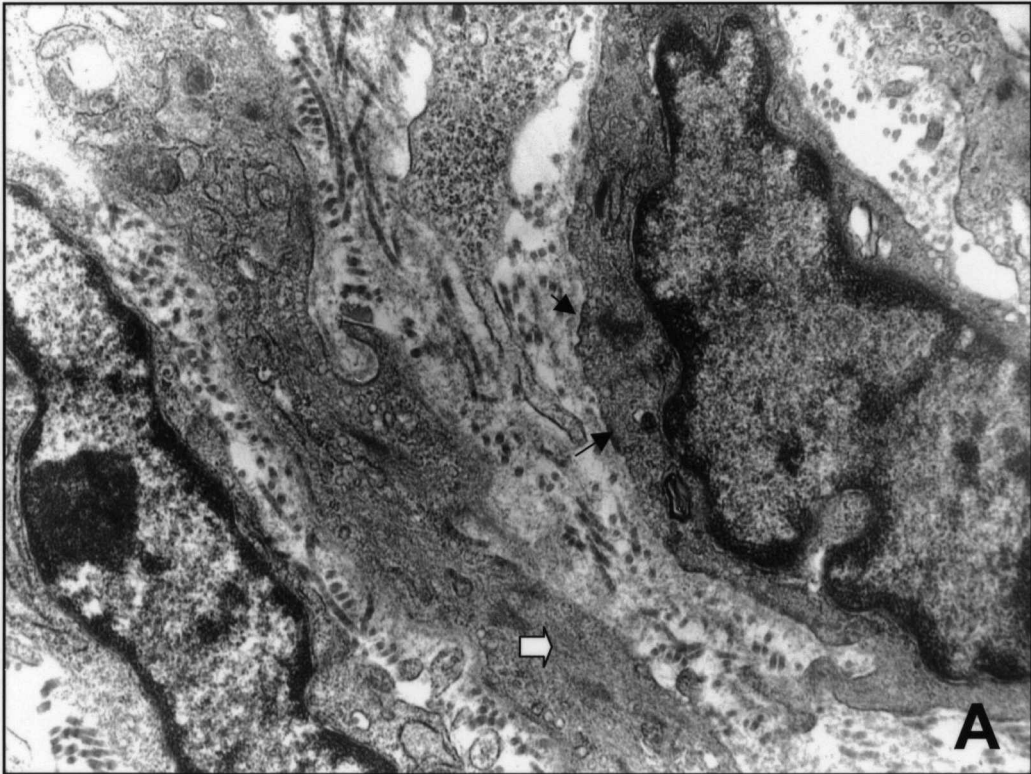
Figura A

Miofibroblastos exibindo núcleos chanfrados, miofibrilas (setas largas) e reforços submembranares (setas estreitas), demonstrando atividade sintética e apresentando no interstício fibras colágenas em uma estrutura frouxa. Algumas fibras se dispõem paralelamente e outras apresentam-se fragmentadas, com tamanhos e calibres diferentes. Animal tratado com 4 J/cm^2 , e sacrificado 5 dias após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 7000 X.

Figura B

Célula exibindo compactação das estruturas citoplasmáticas e condensação da cromatina nuclear. No citoplasma da célula adjacente, observa-se internalização de colágeno (setas). Animal controle sacrificado 7 dias após o procedimento cirúrgico. Eletromicrografia. 7000 X.

Prancha 13



10 GRÁFICOS

Gráfico 01

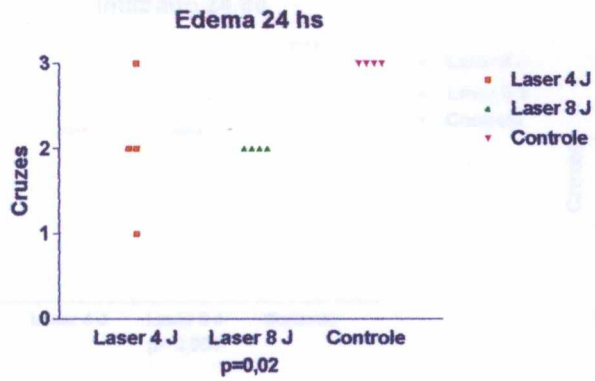


Gráfico 02

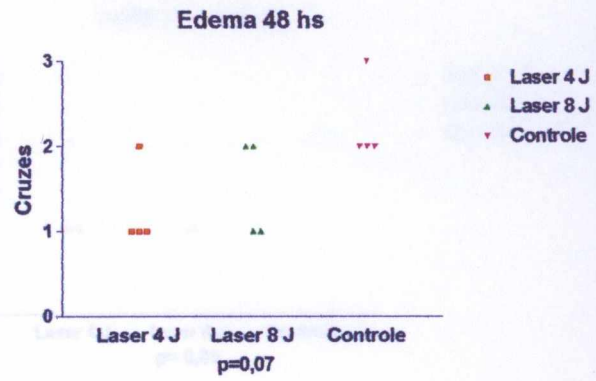


Gráfico 03

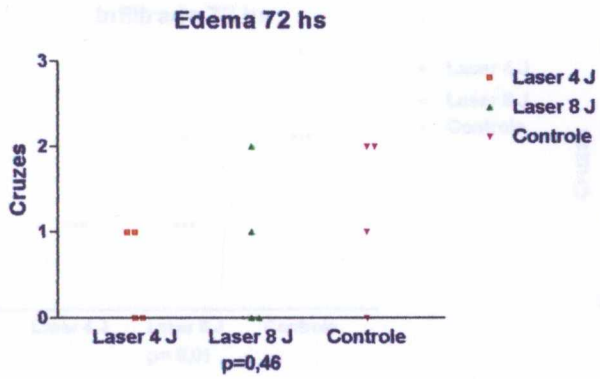


Gráfico 04

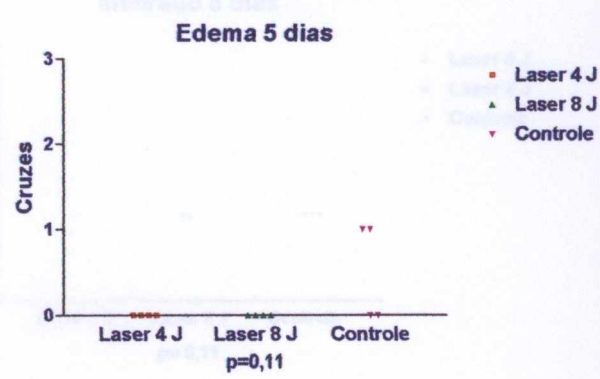


Gráfico 05

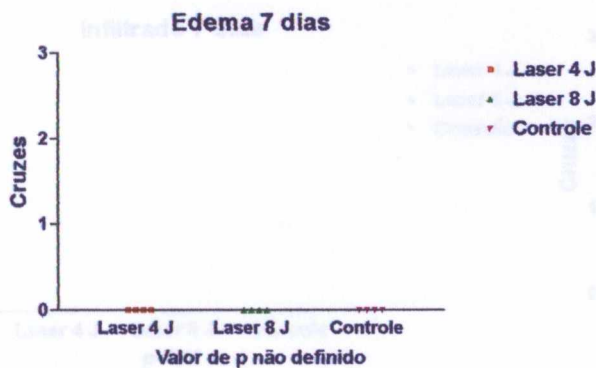


Gráfico 06

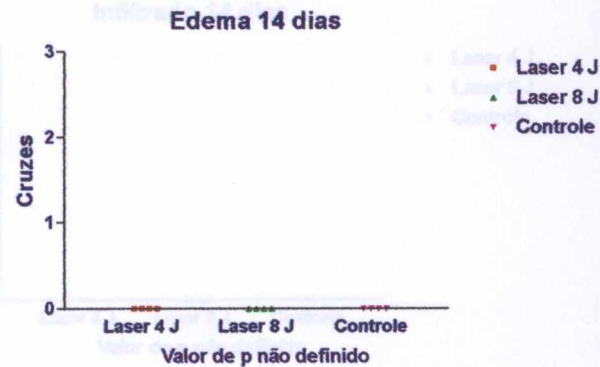


Gráfico 07

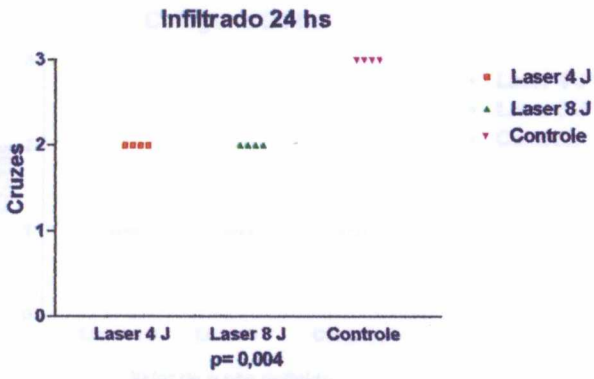


Gráfico 08

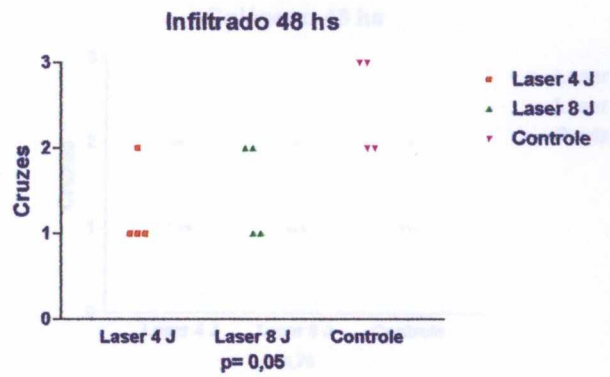


Gráfico 09

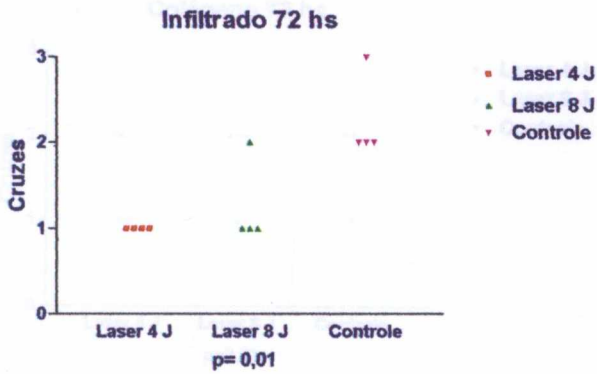


Gráfico 10



Gráfico 11

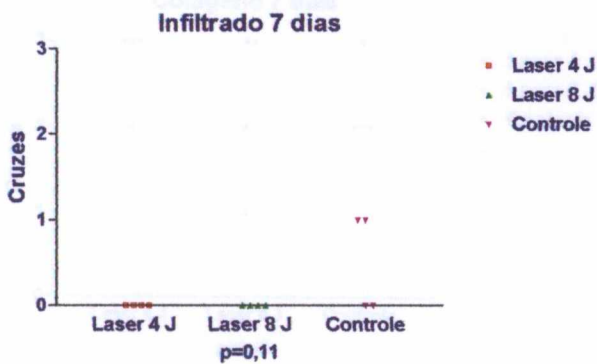


Gráfico 12

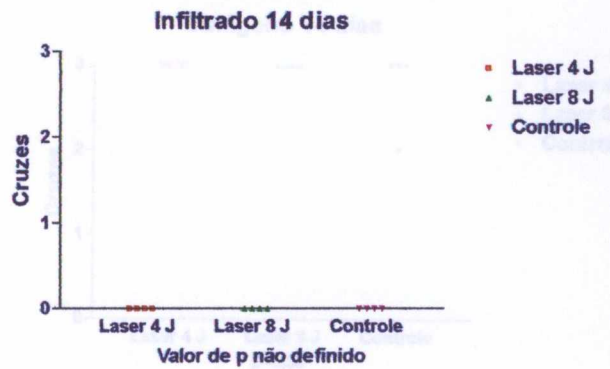


Gráfico 13

Colágeno 24 hs

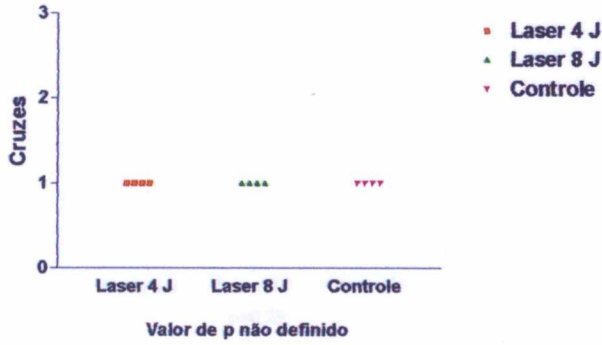


Gráfico 14

Colágeno 48 hs

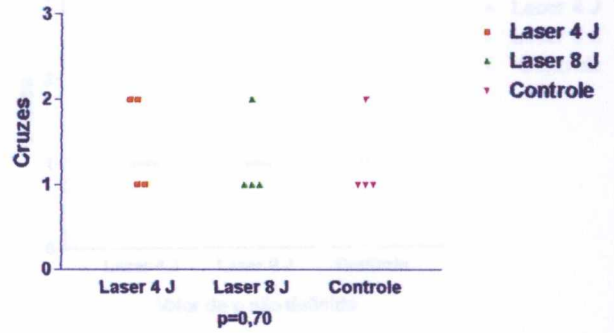


Gráfico 15

Colágeno 72 hs

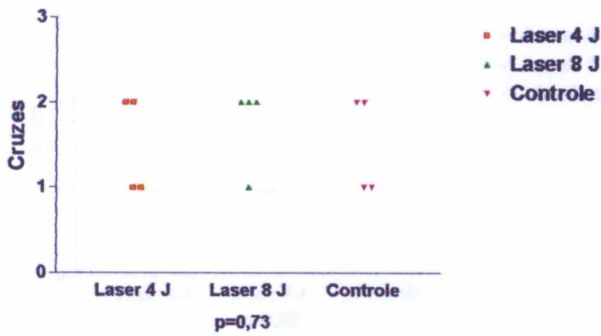


Gráfico 16

Colágeno 5 dias

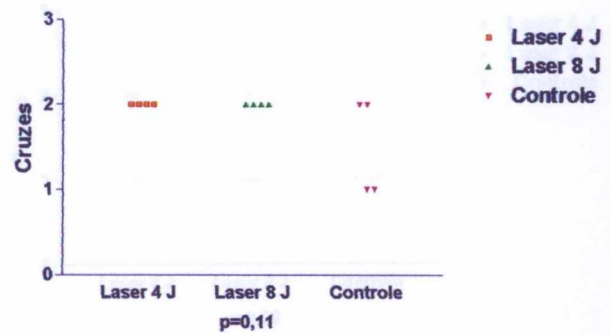


Gráfico 17

Colágeno 7 dias

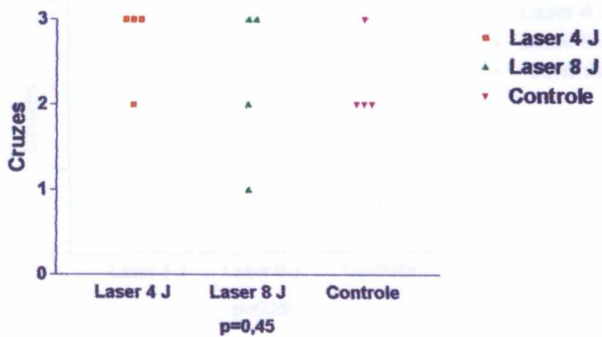


Gráfico 18

Colágeno 14 dias

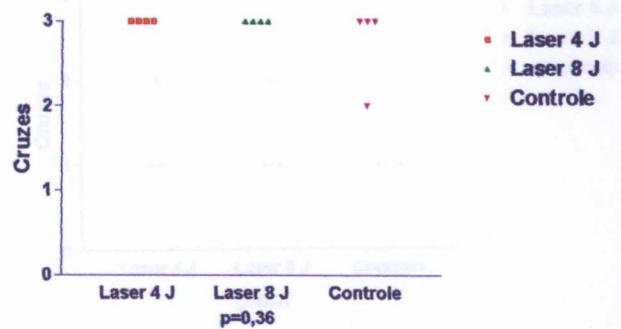


Gráfico 19

Fibras elásticas 24 hs

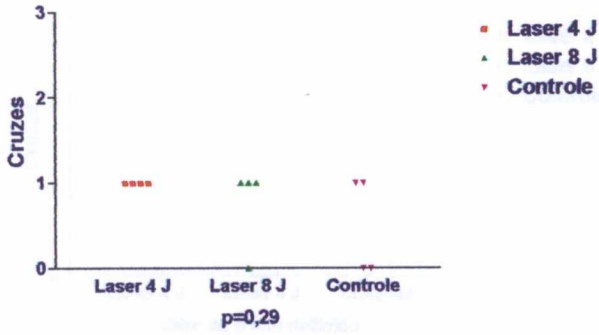


Gráfico 20

Fibras elásticas 48 hs



Gráfico 21

Fibras elásticas 72 hs

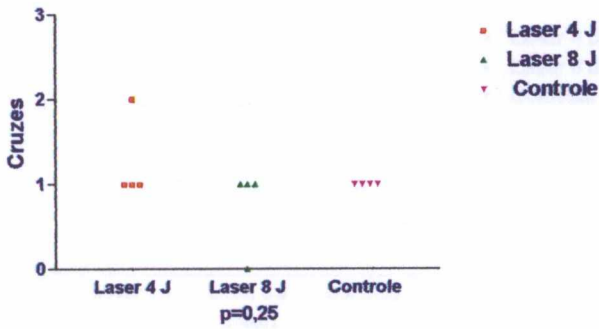


Gráfico 22

Fibras elásticas 5 dias

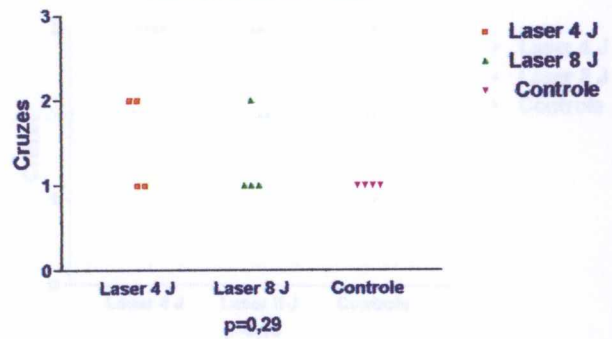


Gráfico 23

Fibras elásticas 7 dias

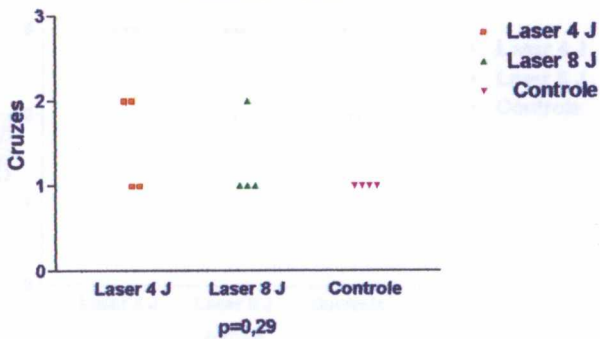


Gráfico 24

Fibras elásticas 14 dias

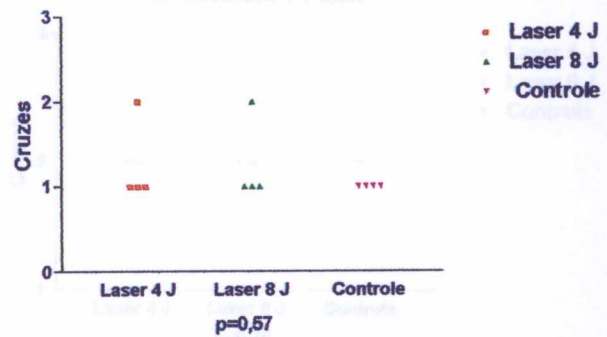


Gráfico 25

Anti-desmina 24 hs

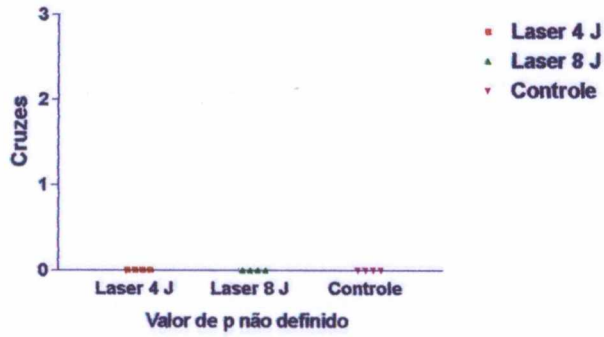


Gráfico 26

Anti-desmina 48 hs

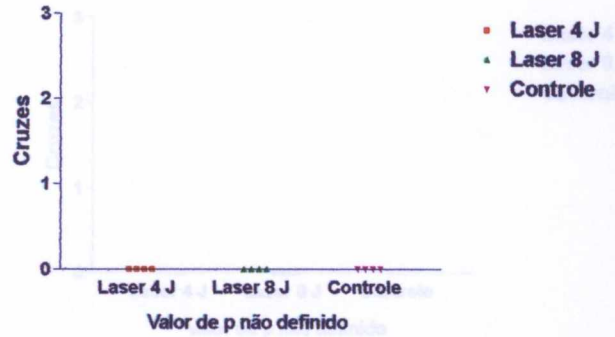


Gráfico 27

Anti-desmina 72 hs

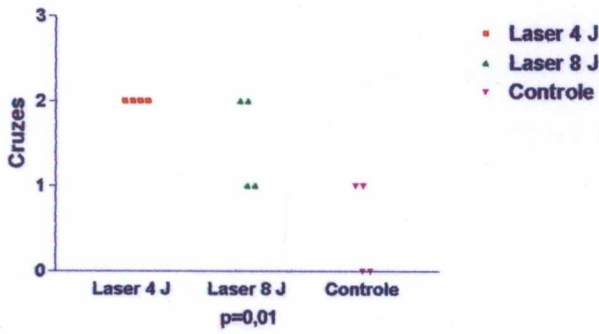


Gráfico 28

Anti-desmina 5 dias

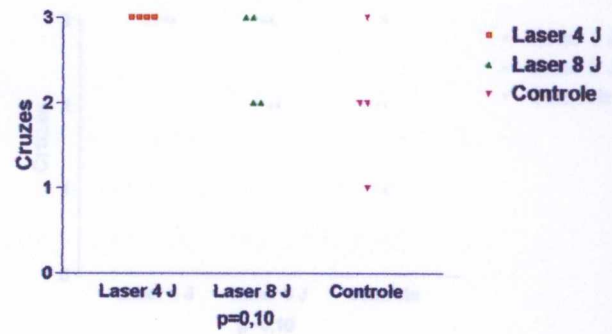


Gráfico 29

Anti-desmina 7 dias

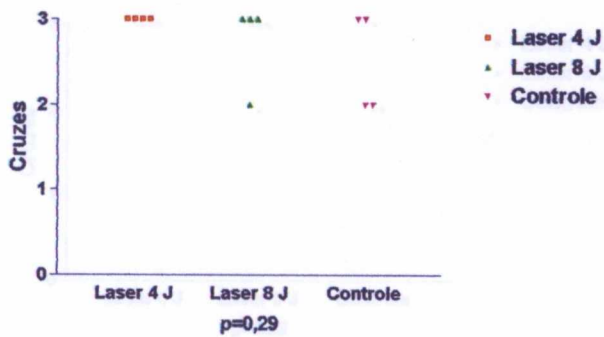


Gráfico 30

Anti-desmina 14 dias

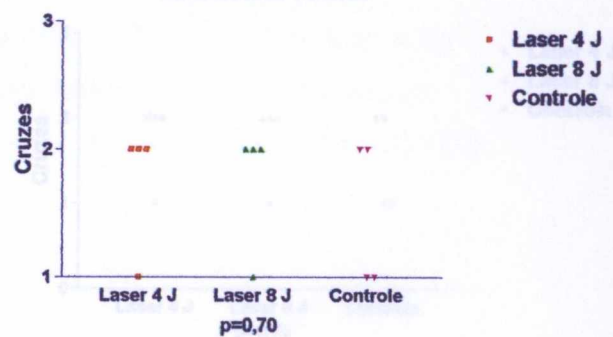


Gráfico 31

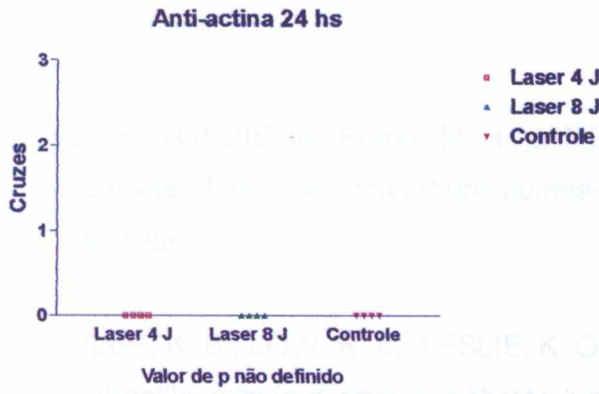


Gráfico 32

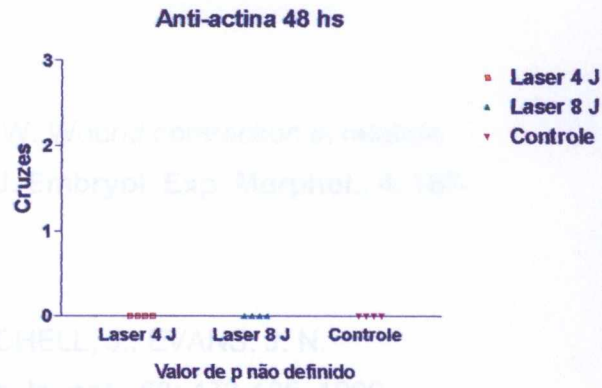


Gráfico 33

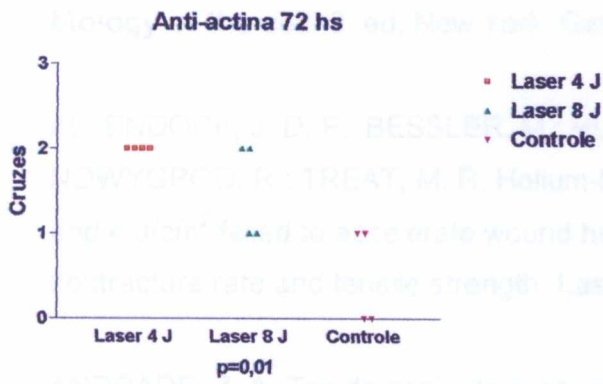


Gráfico 34

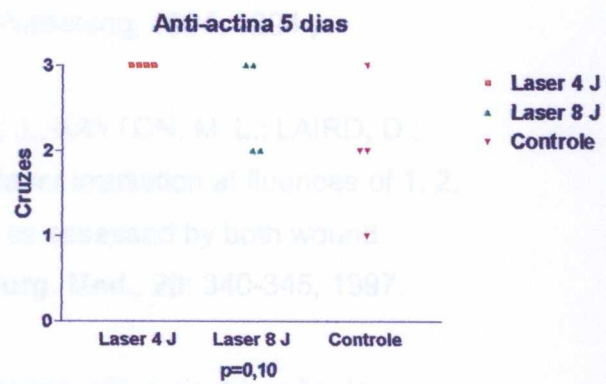


Gráfico 35

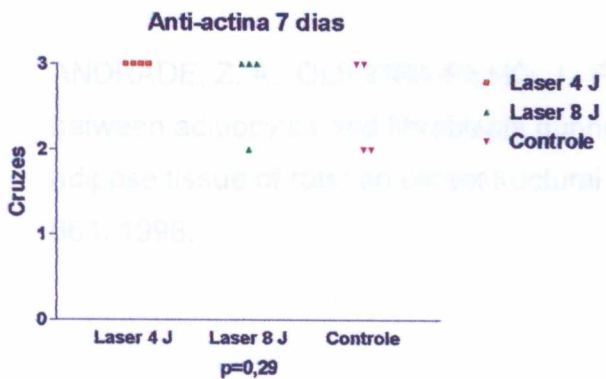


Gráfico 36



11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M.; FLINT, M. H.; JAMES, D. W. Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea-pigs. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, **4**: 167-175, 1956.

ADLER, K. B.; LOW, R. B.; LESLIE, K. O.; MITCHELL, J.; EVANS, J. N. Contractile cells in normal and fibrotic lung. **Lab. Invest.**, **60**: 473-485, 1989.

AGREN, M. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelization of cutaneous wounds. **Arch. Dermatol. Res.**, **291**: 583-590, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.

ALLENDORF, J. D. F.; BESSLER, M.; HUANG, J.; KAYTON, M. L.; LAIRD, D.; NOWYGRÓD, R.; TREAT, M. R. Helium-Neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Lasers Surg. Med.**, **20**: 340-345, 1997.

ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. Atheneu, 1999. cap. 8, p. 135-151.

ANDRADE, Z. A.; GUERRET, S.; FERNANDES, A. L. M. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 87-93, 1999.

ANDRADE, Z. A.; OLIVEIRA-FILHO, J.; FERNANDES, A. L. M. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an ultrastructural study. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**: 659-664, 1998.

- AUN, C. E.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R. G. Raio laser – Hipersensibilidade dentinária. Avaliação clínica de pacientes portadores de hipersensibilidade dentinária, cujos dentes foram tratados com raio laser Hélio-Neon. **Rev. APCD**, **43**: 65-68, 1989.
- BASFORD, J. R. Low energy laser treatment of pain and wounds: Hype, Hope, or Hokun? **Mayo Clin. Proc.**, **61**: 671-675, 1986.
- BAXTER, G. D.; BELL, A. J.; ALLEN, J. M.; RAVEY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, **77**: 171-178, 1991.
- BISHT, D.; GUPTA, S. C.; MISRA, V.; MITAL, V. P.; SHARMA, P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, **100**: 43-46, 1994.
- BOREL, J. P.; MAQUART, F. X. Mécanismes moléculaires de la cicatrisation des blessures. **Ann. Biol. Clin.**, **56**: 11-19, 1998.
- BRAVERMAN, B.; McCARTHY, R. J.; IVANKOVICH, A. D.; FORDE, D. E.; OVERFIELD, M.; BAPNA, M. S. Effect of Helium-Neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.**, **9**: 50-58, 1989.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia Moderna**. Pancast, 1998. 356 p.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds**, **10**: 12-32, 1998.
- CARREL, A.; HARTMANN, A. Cicatrization of wounds. I. The relation between the size of a wound and the rate of its cicatrization. **J. Exp. Med.**, **24**: 429-450, 1916.
- CONLAN, M. J.; RAPLEY, J. W.; COBB, C.M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. **J. Clin. Periodontol.**, **23**: 492-496, 1996.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab. Invest.**, **63**: 21-29, 1990.

DAVIS, R. L.; LASSAR, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. **Cell**, **51**: 987-1000, 1987.

DESMOULIÉRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am. J. Pathol.**, **146**: 56-66, 1995.

DESMOULIÉRE, A.; RUBBIA-BRANDT, L.; ABDIU, A.; WALZ, T.; MACIEIRA-COELHO, A.; GABBIANI, G. Alpha smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by gamma-interferon. **Exp. Cell Res.**, **201**: 64-73, 1992.

EDDY, R. J.; PETRO, J.; TOMASEK, J. J. Evidence for the nonmuscle nature of the myofibroblast of granulation tissue and hypertrophic scar – an immunofluorescence study. **Am. J. Pathol.**, **130**: 252-260, 1988.

EHRlichMAN, R. J.; SECKEL, B. R.; BRYAN, D. J.; MOSCHELLA, C. J. Common complications of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, **71**: 1323- 1351, 1991.

EPSTEIN, F. H. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New Engl. J. Med.**, **338**: 436-445, 1998.

FAULK, W. P.; DEMAeyer, E. M.; DAVIES, A. J. S. Some effects of malnutrition on the immune response in man. **Am. J. Clin. Nutr.**, **27**: 638-646, 1974.

FENG, D.; NAGY, J. A.; PYNE, K.; DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. **J. Exp. Med.**, **187**: 903-915, 1998.

FOLKMAN, J. Is there a field of wound pharmacology? **Ann. Surg.**, **215**: 1-2, 1992.

FREITAS, L. A. R. **Fibrogênese e diferenciação celular (Estudo histológico, ultra-estrutural e imuno-citoquímico com o modelo do bolsão inflamatório de Selye, em ratos)**. 1988. 162 f. Mestrado (Dissertação em Patologia Humana)- Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GABBIANI, G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. **Pathol. Res. Pract.**, **190**: 851-853, 1994.

GABBIANI, G. Some historical and philosophical reflections on the miofibroblast concept. **Curr. Topics Pathol.**, **93**: 1-5, 1999.

GABBIANI, G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. **Pathol. Res. Pract.**, **192**: 708-711, 1996.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R.; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. **J. Exp. Med.** **135**: 719-734, 1972.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experimentia**, **27**: 549-550, 1971.

GAME, S. M.; STONE, A.; MATTHEWS, J. B.; SCULLY, C.; PRIME, S.S. Differentiation of malignant oral rat keratinocytes reflects changes in EGF and TGF- β receptor expression but not growth factor dependence. **Carcinogenesis**, **12**: 409-416, 1991.

GARCIA, C. S. Laser, a luz que aponta o futuro. **Rev. ABO Nac.**, **5**: 286-290, 1997.

GARCIA, V. G.; OKAMOTO, T.; KINA, J. R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, **25**: 37-48, 1996.

GENOVESE, W. J.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R.G. **Laser na odontologia**. São Paulo: Pancast. 1991. 61 p.

GHADIALLY, F. N. Lysosomes. In:_____. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 4th ed. Washington: Butterworth-Heinemann, 1997. cap. 7, p. 756-759.

GHADIALLY, F. N.; McNAUGHTON, J. D.; LALONDE, J. M. A. Myofibroblastoma: a tumor of myofibroblasts. **J. Submicrosc. Cytol.**, **15**: 1055-1063, 1983.

GOMEZ-VILLAMANDOS, R. J.; VALENZUELA, J. M. S.; CALATRAVA, I. R.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; JURADO, I. A. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. **Lasers Surg. Med.**, **16**: 184-188, 1995.

GOWN, A. The mysteries of the myofibroblast (partially) unmasked. **Lab. Invest.**, **63**: 1-2, 1990.

GRANVILLE, D. J.; CARTHY, C. M.; HUNT, D. W. C.; MCMANUS, B. M. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**, **78**: 893-907, 1998.

GROSS, R. L. The effect of ascorbate on wound healing. **Int. Ophthalmol. Clin.**, **40**: 51-57, 2000.

HAAS, F.; ISSEROFF, R. R.; WHEELAND, R. G.; ROOD, P. A.; GRAVES, P. J. Low-energy Helium-Neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, **94**: 822-826, 1990.

HARAZAKI, M.; TAKAMASHI, H.; ITO, A.; ISSHIKI, Y. Soft laser irradiation induced pain reduction in orthodontic treatment. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, **39**: 95-101, 1998.

HASAN, W.; ZHANG, R.; LIU, M.; WARN, J. D.; SMITH, P. G. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. **Cell Tissue Res.**, **300**: 97-109, 2000.

HULSEWÉ, K. W. E.; ACKER, B. A. C.; MEYENFELDT, M. F.; SOETERS, P. B. Nutritional depletion and dietary manipulation: Effects on the immune response. **World J. Surg.**, **23**: 536-544, 1999.

KANA, S. J.; HUTSCHENREITER, G.; HAINA, D.; WAIDELICH, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, **116**: 293-296, 1981.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **J. Quant. Electr.**, **23**: 1704-1717, 1987.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, **56**: 691-704, 1989.

KAY, S. P.; MORELAND, J. R.; SCHMITTER, E. Nutritional status and wound healing in lower extremity amputations. **Clin. Orthop.**, **217**:253-256, 1987.

KIBE, Y.; TAKENAKA, H.; KISHIMOTO, S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. **Br. J. Dermatol.**, **143**: 720-727, 2000.

KUHN, C.; McDONALD, J. A. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am. J. Pathol.**, **138**: 1257-1265, 1991.

LANNING, D. A.; DIEGELMANN, R. F.; YAGER, D. R.; WALLACE, M. L.; BAGWELL, C. E.; HAYNES, J. H. Myofibroblast induction with transforming growth factor- β 1 in cutaneous fetal excisional wounds. **J. Pediatr. Surg.**, **35**: 183-188, 2000.

LEINWOLL, S. **Understanding Lasers and Masers**. New York: John F. Rider Publisher, 1965. 87 p.

LIPPER, S.; KAHN, L. B.; REDDICK, R. L. The myofibroblast – historical perspective. **Pathol. Ann.**, **15**: 409-441, 1980.

LIZARELLI, R. F. Z. Irradiação laser de baixa densidade de potência: seu bom uso e indicações. Apresentação de um caso clínico. **APCD**, **4**: 4, 1997.

LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDESLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers Surg. Med.**, **14**: 347-354, 1994.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, **187**: 493-494, 1960.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissues and Disease**. Massachusetts: Blackwell Science, 1996. 974 p.

MARCHESE, C.; CHEDID, M.; DIRSCH, O. R.; CSAKY, K. G.; SANTANELLI, F.; LATINI, C.; LAROCHELLE, W. J.; TORRISI, M. R.; ARONSON, S. A. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. **J. Exp. Med.**, **182**: 1369-1376, 1995.

MAREI, M. K.; ABDEL-MEGUID, S. H.; MOKHTAR, S. A.; RIZK, S. A. Effect of low-energy laser application in the treatment of denture-induced mucosal lesions. **J. Prosth. Dent.**, **77**: 256-264, 1997.

MASUR, S. K.; DEWAL, H. S.; DINH, T. T.; ERENBURG, I.; PETRIDOU, S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **93**: 4219-4223, 1996.

MATTE, C.; CADOTTE, M.; SCHÜRCH, W. Intermediate filament proteins and actin isoforms of dermatofibrosarcoma protuberans and dermatofibroma. **Lab. Invest.**, **62**: 64, 1990.

MAYER, G.; LEINWAND, L. A. Sarcomeric gene expression and contractility in myofibroblasts. **J. Cell Biol.**, **139**: 1477-1484, 1997.

McCOMB, G. **The Laser Cookbook**. New York: TAB Books, 1988. 404 p.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE B.; TOTA, J. G. Effect of laser rays on wound healing. **Am. J. Surg.**, **122**: 532-535, 1971.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B. Effect of laser rays on wound healing. **Bull. Soc. Inter. Chirurg.**, **32**: 169-173, 1973.

MEYERS, A. D. Lasers and wound healing. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, **116**: 1128, 1990.

MISERANDINO, L. J.; PICK, R. M. **Lasers in Dentistry**. Chicago: Quintessence Publishing, 1995. p. 20-25.

NICCOLI-FILHO, W. D.; OKAMOTO, T.; CARDENUTO, N.; PICON, L. C. Efeitos da radiação laser do tipo Hélio-Neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, **22**: 213-221, 1993.

NOBLE, P. B.; SHIELDS, E. D.; BLECHER, P. D. M.; BENTLEY, K. C. Locomotory characteristics of fibroblasts within a three-dimensional collagen lattice: Modulation by a Helium/Neon soft laser. **Lasers Surg. Med.**, **12**: 669-674, 1992.

OLAH, I.; KENDALL, C.; GLICK, B. Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's bursa of Fabricius. **Anat. Rec.**, **232**: 121-125, 1992.

OLIVEIRA, J. A. G. P. **Ação da radiação laser (Arsênio-Gálio no reparo alveolar de feridas de extração dental infectadas)**. 1992. 64 f. Doutorado (Tese em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) UNESP, Araçatuba.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; ABIKO, Y. Low-energy diode laser irradiation reduced plasminogen activator activity in human periodontal ligament cells. **Lasers Surg. Med.**, **21**: 456-463, 1997.

PALMGREN, N.; JENSEN, G. F.; KAAE, K.; WINDELIN, M.; COLOV, H. C. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis. **Lasers Med. Sci.**, **4**: 193-196, 1989.

PASSARELA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon laser. **FEBS Lett.**, **175**: 95-99, 1984.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. 1589 p.

PETROLL, W. M.; JESTER, J. V.; BEAN, J. J.; CAVANAGH, H. D. Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor- β_1 , β_2 , and β_3 . **Invest. Ophthalmol.**, **39**: 2018-2032, 1998.

PITTET, B.; RUBBIA-BRENDT, L.; DESMOULIÉRE, A.; SAPPINO, A.; ROGGERO, P.; GUERRET, S.; GRIMAUD, J.; LACHER, R.; MONTANDON, D.; GABBIANI, G. Effect of gamma-interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease: an open pilot study. **Plast. Reconst. Surg.**, **93**: 1224-1235, 1993.

- POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A.; SOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **Am. J. Pathol.**, **137**: 171-178, 1990.
- POWELL, D. W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **Am. J. Physiol.**, **277**: C1-19, 1999.
- RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor- β 1 in quiescent human breast gland fibroblasts - implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. **Lab. Invest.**, **68**: 696-707, 1993.
- RUBBIA-BRANDT, L.; SAPPINO, A.; GABBIANI, G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-actin containing myofibroblasts. **Virch. Arch. B. Cell Pathol.**, **60**: 73-82, 1991.
- SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthopedics**, **111**: 525-532, 1997.
- SAPPINO, A. P.; SCHÜRCH, W. GABBIANI, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells; expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. **Lab. Invest.**, **63**: 144-161, 1990.
- SAYED, S. O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Lasers Surg. Med.**, **10**: 559-568, 1990.
- SCHMITT-GRÄFF, A.; DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblasts phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. **Virch. Arch.**, **425**: 3-24, 1994.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L.; JURECKA, W.; HÖNIGSMANN, H.; BREIER, F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **40**: 481-484, 1999.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHÖN, H.; KNOBLER, R.; HAVELEC, L.; SCHINDL, L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, **21**: 580-584, 1998.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T. A.; GABBIANI, G. Myofibroblast. In: STENBERG, S. S. **Histology for pathologists**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott/ Raven, 1997. cap, 7, p. 129-161.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T. A.; LAGACÉ, R. Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. **Virch. Arch.**, **391**: 125-139, 1981.

SCHÜRCH, W.; SKALLI, O.; SEEMAYER, T. A.; GABBIANI, G. Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. **Am. J. Pathol.**, **128**: 91-103, 1987.

SEEMAYER, T. A.; LAGACÉ, R.; SCHÜRCH, W. On the pathogenesis of sclerosis and nodularity in nodular sclerosing Hodgkin's disease. **Virch. Arch. A. Pathol. Anat. Histol.**, **385**: 283-291, 1980.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp. Cell Res.**, **250**: 273-283, 1999.

SHUM, D. T.; McFARLANE, R. M. Histogenesis of Dupuytren's disease: an immunohistochemical study of 30 cases. **J. Hand Surg.**, **13A**: 61-67, 1988.

SIEGBAHN, A.; JOHNELL, M.; RORSMAN, C.; EZBAN, M.; HELDIN, C.; RÖNNSTRAND, L. Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. **Blood**, **96**: 3452-3458, 2000.

SILVEIRA, J. C.; LOPES, E. E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs 904 nm (Estudo experimental em cobaias – CAVIA PORCELUS). **Arq. Cent. Estud. Odontol., UFMG, 28**: 73-96, 1991.

SILVEIRA, J. C.; LOPES, E. E.; SILVEIRA, L. B. Avaliação quantitativa da drenagem do exsudato de bolsas periodontais supra-ósseas antes e após a aplicação do raio laser GaAs 904 nm. **Arq. Cent. Estud. Odontol., UFMG, 29**: 57-68, 1992.

SKALLI, O.; SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T.; LAGACÉ, R.; MONTANDON, D.; PITTET, B.; GABBIANI, G. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. **Lab. Invest., 60**: 275-285, 1989.

SKINNER, S. M.; GAGE, J. P.; WILCE, P. A.; SHAW, R. M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust. Dent. J., 41**: 188-192, 1996.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. P. Cutaneous wound healing: A current perspective. **J. Oral Maxillofac. Surg., 53**: 442-447, 1995.

TIMIMI, F. K.; TING, H. H.; HALEY, E. A.; RODDY, M.; GANZ, P.; CREAGER, M. A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol., 31**: 552-557, 1998.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. Angiogenesis in wound healing. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc., 5**: 40-46, 2000.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Low Level Laser Therapy – Clinical practice and scientific background**. Spjutvägen: Prima Books, 1999. 403 p.

VEÇOSO, M. C. **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993. 143 p.

YAMADA, K. M. Fibronectin peptides in cell migration and wound repair. **J. Clin. Invest.**, **105**: 1507-1509, 2000.

YOKOSEKI, M.; BABA, Y.; SHIMOKAWA, H.; MORIYAMA, K.; KURODA, T. Interferon-gamma inhibits the myofibroblastic phenotype of rat palatal fibroblasts induced by transforming growth-factor β_1 in vitro. **Febs Lett.**, **442**: 61-64, 1999.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **Photochem. Photobiol.**, **59**: 167-170, 1994.

ZWIRNER, J.; WERFEL, T.; WILKEN, H. C.; THEILE, E.; GOTZE, O. Anaphylatoxin C3a but not C3a (desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. **Eur. J. Immunol.**, **28**:1570-1577, 1998.