

Uso combinado da laserterapia de baixa potência e da inibição da ciclooxigenase-2 na reepitelização de ferida incisional em pele de camundongos: um estudo pré-clínico*

Combined use of low level laser therapy and cyclooxygenase-2 selective inhibition on skin incisional wound reepithelialization in mice: a preclinical study

Cíntia Helena Santuzzi¹

Diego França Pedrosa³

Breno Valentim Nogueira⁵

Hygor Franca Buss²

Martha Oliveira Vieira Moniz Freire⁴

Washington Luiz Silva Gonçalves⁶

Resumo: FUNDAMENTOS: A laserterapia de baixa potência e os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (ICOX2) vem sendo muito utilizados para modular a resposta inflamatória, entretanto, os seus efeitos na reepitelização de feridas não são bem compreendidos.

OBJETIVO: Avaliar os efeitos isolados e combinados da laserterapia de baixa potência e da ICOX2 na reepitelização de ferida incisional na pele de camundongos.

MÉTODO: Foi induzida uma ferida de 1 cm no dorso de cada camundongo, que foram divididos em quatro grupos (N=20): Controle, Laserterapia, Tratados com celecoxib e Terapia conjugada. Os animais dos grupos celecoxib e Terapia conjugada foram tratados com celecoxib por 10 dias antes da incisão cutânea. As feridas experimentais foram irradiadas com laserterapia de baixa potência He-Ne (632nm, dose: 4J/cm²) em varredura, por 12 segundos durante três dias consecutivos nos grupos Laserterapia e Terapia conjugada. Os animais foram sacrificados no 3º dia de pós-operatório. Amostras das feridas foram coletadas e coradas (Tricromio de Masson) para análise histomorfométrica. RESULTADOS: Tanto o grupo Laserterapia, quanto o grupo celecoxib, mostrou aumento da reepitelização cutânea em relação ao grupo Controle, entretanto, o grupo Terapia conjugada não apresentou diferenças. Quanto à queratinização o grupo Laserterapia e Terapia conjugada apresentaram redução dos queratinócitos, comparados com o grupo Controle.

CONCLUSÕES: Os resultados mostram que o uso da laserterapia de baixa potência e da ICOX2 isoladamente aumentam as células epiteliais, mas somente a laserterapia de baixa potência reduziu os queratinócitos cutâneos. O tratamento conjugado restabelece a reepitelização inata e diminui a queratinização, embora ocorra uma acelerada contração da ferida com melhora na organização da ferida na pele de camundongos.

Palavras-chave: Cicatrização; Células epiteliais; Inibidores de ciclooxigenase 2; Queratinócitos; Terapia a Laser

Abstract: BACKGROUND: Low level laser therapy and cyclooxygenase-2 (ICOX2) selective inhibitors have been widely used to modulate inflammatory response; however, their effect on wound reepithelialization are not well understood.

OBJECTIVE: To evaluate the isolated and combined effects of low level laser therapy and ICOX2 in the reepithelialization of skin incisional wounds in mice.

METHODS: We induced a 1-cm wound on the back of each mouse, which were divided into four groups (N = 20): control, laser therapy, treated with celecoxib and combined therapy. The animals in the celecoxib and combined therapy groups were treated with celecoxib for 10 days before skin incision. The experimental wounds were irradiated with He-Ne low power laser (632nm, dose: 4J/cm²) in scanning for 12 seconds during three consecutive days in the laser therapy and combined therapy groups. The animals were sacrificed 3 days after surgery. Samples of the wounds were collected and stained (Masson's Trichrome) for histomorphometric analysis.

RESULTS: Both the laser therapy group and the celecoxib group showed an increase in skin reepithelialization compared to the control group; however, the combined therapy group showed no differences. As for keratinization, the laser therapy and combined therapy groups showed a reduction in keratinocytes compared with the control group.

CONCLUSION: The results show that the use of low level laser therapy and ICOX2 in isolation increases epithelial cells, but only low level laser therapy reduced skin keratinocytes. The combined treatment restores innate epithelialization and decreases keratinization in spite of accelerating wound contraction with improvement in the organization of the wound in the skin of mice.

Keywords: Cyclooxygenase 2 inhibitors; Epithelial cells; Keratinocytes; Laser therapy; Wound healing

Recebido em 20.01.2010.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 24.06.10.

* Trabalho realizado no Universidade Federal do Espírito Santo - UFES - Vitória (ES), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest: None*

Suporte financeiro: Nenhum / *Financial funding: None*

¹ Doutoranda em ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Professora da Faculdade Salesiana de Vitória (UNISALES) - Vitória (ES), Brasil.

² Graduando de medicina pela Universidade Federal do Espírito Santo - Aluno de Iniciação Científica - Vitória (ES), Brasil.

³ Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Professor assistente do Departamento de Ciências Farmaceuticas da UFES - Vitória (ES), Brasil.

⁴ Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Professora assistente da disciplina de Fisiologia da Faculdade Vitoriana (FAVI) - Vitória (ES), Brasil.

⁵ Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Professor adjunto do Departamento de Morfologia da UFES - Vitória (ES), Brasil.

⁶ Doutor em Ciência Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo. - Professor Colaborador do Departamento de Ciência Fisiológicas da Universidade do Espírito Santo - Vitória (ES), Brasil.

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico que envolve células sanguíneas, mediadores celulares, matriz extracelular (MEC) e células parenquimatosas. De maneira clássica, três fases ocorrem consecutivamente no processo de reparo cutâneo: *inflamação*, *proliferação* (formação do tecido granulado) e *regeneração* (remodelamento tecidual). A compreensão dessas fases permite a identificação de uma cicatrização normal da pele; o reconhecimento de quando uma intervenção é necessária, e a coerência quanto à aplicação de uma terapia adjuvante.^{1,2} Nas fases inflamatória e proliferativa, ou seja, primeira e segunda fases do processo de reparo cutâneo, os queratinócitos na borda de uma ferida epidérmica migram, proliferam, e diferenciam-se a fim de cobrir a superfície exposta da ferida; em seqüência neutrófilos, macrófagos e capilares produzem um novo tecido de granulação. Cada passo deste intrincado processo pode ser regulado por inúmeras substâncias bioativas liberadas no local e/ou oriunda do sistema, as quais incluem citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, componentes da MEC, prostanoídes, além de espécies reativas de oxigênio (ERO).^{1,4}

Estudos clássicos mostram que as prostaglandinas (PGs), prostanoídes formados pelas ações das fosfolipases (isomerases teciduais específicas) no ácido araquidônico (AA) dos fosfolípidos da membrana celular, estão diretamente envolvidas no processo de reparo tecidual. Dentre as inúmeras funções das PGs está o controle local do metabolismo tissular e consequentemente da dinâmica de cicatrização de feridas cutâneas. As enzimas lipooxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX) são duas clássicas dessas isomerases teciduais que convertem AA em PGs.^{4,5} Atualmente, estão identificadas duas isoformas de COX, uma forma constitutiva (COX₁) e outra forma homóloga induzível (COX₂).

As drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados para modular a resposta inflamatória aguda (RIA) no processo de reparo tecidual. Há muito se sabe que essas drogas exercem seus efeitos na RIA pela inibição da síntese de PGs. Assim, os AINEs atualmente disponíveis são utilizados para inibir a síntese de PGs e de enzimas como as COXs modulando a RIA.⁵⁻⁸ Em adição, está estabelecido que o uso de inibidores seletivos das ciclooxigenases (ICOX), além de inibir a síntese de PGs, também reduzem a síntese e a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), o que interfere na estrutura e funcionalidade da pele lesada retardando o processo de reparo inato.⁵⁻¹⁰

O laser é uma forma de amplificação da luz por emissão estimulada de radiação; o termo originou-se da abreviação: *Light amplification by stimulated*

emission of radiation, estando basicamente classificada como de “alta potência” e de “baixa potência”. A terapia laser de baixa potência (LTBP) têm sido amplamente utilizada em inúmeras áreas biomédicas, principalmente, com objetivo de modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de reparo tecidual.^{1,2,11-14} Recentes investigações demonstram a influência da LTBP na dinâmica de cicatrização da pele e de outros tecidos, entretanto, apresenta ainda algumas controvérsias, devido à grande variabilidade e divergência nos parâmetros de irradiação, além das discrepâncias nos achados biológicos.¹⁴⁻¹⁶ Estudos prévios em nosso laboratório e de outros autores têm sugerido que a foto-estimulação pelo laser parece ocorrer durante as fases inflamatórias e proliferativas da cicatrização, justamente devido à suas interferências na biomodulação dos eicosanóides, principalmente as PGs, e no sistema enzimático oxidativo cutâneo.^{1,2,5,11-19}

Deste modo, tornam-se oportunos estudos que mostrem os efeitos dos tratamentos combinados na cicatrização de feridas cutâneas, uma vez que tanto a laserterapia, quanto o uso de ICOX atuam no mesmo período do processo de reparo, ou seja, ambos os tratamentos isolados afetam as fases inflamatória e proliferativa da cicatrização da pele em animais e humanos. Diante disso, o objetivo do presente estudo pré-clínico foi avaliar os efeitos isolados e combinados da terapia laser de baixa potência (LTBP) hélio-neônio (He-Ne, 632nm) e da inibição seletiva da ciclooxigenase-2 (ICOX₂) na reepitelização de feridas cutâneas cirúrgica em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 camundongos suíços machos (*Webster*) com 12 semanas de idade e peso corporal variando de 30-35 gramas, provenientes do Biotério-CCS/UFES. Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente amplo, com temperatura controlada a 22°C e iluminação artificial, sendo o fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro; a alimentação (Purina®) e água foram mantidas *ad libitum*. Os camundongos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (N= 5, cada grupo): 1- Controle (CT); 2- Laserterapia de baixa potência (LS); 3- Tratados com ICOX₂ (CE) e 4- Terapias conjugadas (CE+LS).

A investigação foi conduzida de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide care and use of laboratory* e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob parecer nº 004/2007.

Dez dias antes do procedimento cirúrgico (indução da ferida), 10 camundongos foram previamente tratados com Celebra® (celecoxib, Pfizer Ind.,

Guarulhos, SP, Brasil) na dose de 50 mg.Kg⁻¹, corrigida diariamente pelo peso corporal, administradas por gavagem (VO), garantindo assim os efeitos da droga. No 10º dia de tratamento com inibidor (ICOX₂), os animais foram anestesiados com solução anestésica contendo Ketamina + Xylazina (100 ml + 10 mg.Kg⁻¹, respectivamente, via intraperitoneal), a região dorso-torácica (T₁ - T₇) dos camundongos foi depilada, limpa e, com auxílio de um bisturi, foi realizada uma ferida incisional de 1cm de comprimento em todos os animais experimentais. Em seqüência, foram realizadas as suturas da pele com Steri Strip (3M®, São Paulo, Brasil). Após a sutura, foi irradiada a LTBP por um equipamento laser disponível comercialmente (KLD Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) com as seguintes características: semicondutores de hélio e neônio (He-Ne), ondas contínuas, comprimento de onda de 632 nm, potência de pico de 5 mW, potência média de saída de 0,5 a 3,5 mW e aplicação através de fibra ótica (spot size, 1,5 cm). As feridas experimentais foram irradiadas nos seguintes parâmetros: dose de 4J/cm² por 12s, em cada uma das aplicações nos grupos laser (LS) e terapia conjugada (CE+LS). As irradiações laser foram realizadas pelo método de “varredura” no comprimento total de cada ferida (sutura), permitindo assim seu tratamento uniforme. A primeira aplicação laser ocorreu logo após o ato cirúrgico e as demais aplicações nos dias subseqüentes, totalizando três dias de tratamento. No grupo controle não se utilizou nenhuma forma de tratamento. No terceiro dia de pós-operatório, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, conforme recomendação do COBEA. Amostras de todas as lesões cutâneas foram coletadas de maneira a incluir parte da pele adjacente às bordas unidas da ferida incisional e de todo o tecido cicatricial em sua profundidade.^{2,12,20}

As amostras das lesões cutâneas obtidas foram fixadas em paraformaldeído-10% (pH 7.0) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo modelo “820” Spence, obtendo-se pares de seções de 6µm de espessura. As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes de tecido posteriormente submetidos à coloração por Tricromio de Masson (TM), para posterior análise histológica. Foi realizada captura de imagens de quatro campos microscópicos de cada lâmina histológica com câmera digital (aumento total 100x) do microscópio óptico modelo AX70 Plus (Olympus®, Tóquio, Japão). As análises histomorfométricas foram realizadas e avaliadas através de imagens capturadas por sis-

tema computadorizado de imagens *Sigma-pro*® (Sigma, St Louis, MO, USA), e armazenadas em PC. Ao final do estudo dez pares de imagens foram arquivados, totalizando 50 corte histológicos, os quais foram submetidas à contagem da fração volumétrica (mm²) de queratinócitos (queratinização) e de epitélio (reepitelização) com auxílio de marcação digital por contraste de cor.^{2,20}

Inicialmente foi realizada uma estimativa ideal para amostragem através do software Statemat® 2.0, com poder de teste de 90% e erro de alfa de 0.05, que indicou cinco animais por grupo, totalizando 20 animais experimentais. Na avaliação dos dados realizou-se o teste de normalidade (shapiro-wilk) e análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do teste não-paramétrico de Mann-Witney U, através do software Prism 5.0® (GraphPad, San Diego, CA, USA). Os valores foram expressos como média ± erro padrão (EP) e o nível de significância mínimo adotado para todas as análises foi de p & 0,05.

RESULTADOS

As observações histológicas das amostras das feridas cutâneas de todos os animais evidenciaram pequena quantidade de material fibronectínico (coágulo) sobre a superfície com presença nítida de vasos sanguíneos na profundidade da hipoderme; pouco ou nenhum exsudato na área da sutura. As feridas cutâneas do grupo controle (CT) exibiam padrão de reparação tecidual em fase inflamatória (3º dia de pós-operatório), com formação de crosta e bordas elevadas, com centro avermelhado, devido à presença de irrigação sanguínea na área, o que parecia ter aspecto de tecido de granulação, compatível com o padrão normal de cicatrização (Figura 1A). As feridas do grupo tratado com LTBP He-Ne (LS) apresentavam acelerada reparação mostrando um adiantado restabelecimento morfofuncional tecidual, exibindo cicatriz delineada com bordos bem evidentes e porção central com pequeno desnível, além do aumento expressivo da reepitelização (Figura 1B). Nas feridas do grupo tratado com ICOX₂ (CE) havia padrão de reparação inicial (fase inflamatória), algum coágulo, sem demarcação de bordas da ferida, embora com a presença acentuada de tecido de granulação e grande aumento na reepitelização (Figura 1C). Por outro lado, a terapia combinada (CE+LS) apresentou menos material fibronectínico com uma reepitelização similar ao controle, entretanto, mostrou uma adiantada contração da ferida incisional, melhor organização do botão cicatricial com aparente aceleração do processo de reparo, compatível com 7º a 9º dia de pós-operatório (Figura 1D).

Na histomorfometria epitelial apresentada no gráfico 1A, os resultados obtidos mostraram um significativo ($p < 0,01$) aumento do grau de reepitelização

nos grupos LS ($16,9 \pm 0,8 \text{ mm}^2$) e CE ($19,1 \pm 0,8 \text{ mm}^2$) quando comparados ao grupo CT ($12,6 \pm 0,8 \text{ mm}^2$), no entanto, o grupo CE+LS ($11,8 \pm 0,6 \text{ mm}^2$) mostrou uma restauração dos padrões basais de reepitelização, indicando que a combinação das técnicas eliminou seus efeitos isolados. Já na fração volumétrica de queratinócitos, gráfico 1B, os resultados mostraram uma significativa ($p < 0,05$) redução nos grupos LS ($6,4 \pm 0,2 \text{ mm}^3$) e CE+LS ($5,3 \pm 0,5 \text{ mm}^3$) quando comparados ao grupo CT ($8,1 \pm 0,4 \text{ mm}^3$), todavia no grupo CE ($8,1 \pm 0,8 \text{ mm}^3$) não houve efeitos significativos. Sugerindo que a LTBP, mas não a ICOX₂ modula a migração e diferenciação de queratinócitos na ferida cutânea de camundongos.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra os efeitos da LTBP (He-Ne) e da inibição da enzima COX₂ (celebra[®]) sobre a reepitelização de feridas cirúrgicas, quando utilizadas de forma isolada e combinadas. Os dados obtidos mostraram que tanto a LTBP (He-Ne), quanto a ICOX₂ isoladamente aumenta o grau de reepitelização na pele de camundongos. No entanto, os resultados mostraram também que a combinação dos tratamentos aboliu os efeitos isolados na reepitelização e reduziu o grau de queratinização dos animais experimentais, embora, também tenha demonstrado que essa combinação de tratamento promoveu uma adiantada contração da ferida incisional com melhora

na organização do botão cicatricial na pele de camundongos saudáveis.

A resposta inflamatória induzida pela lesão epidérmica provoca a migração de monócitos, principalmente queratinócitos e neutrófilos, que realizam um rápido consumo de oxigênio (O₂) local.^{3,4} Esse mecanismo ativa a NADPH-oxidase epidérmica, catalisando a transferência de elétrons da NADPH para o O₂, formando o ânion superóxido (O₂⁻), que em maior quantidade ativam enzimas antioxidantes e a óxido nítrico sintetase (NOS). Acredita-se que a laserterapia reduz esse consumo de O₂ local dos neutrófilos e macrófagos, estimula a atividade fagocitária dos leucócitos e a diferenciação dos queratinócitos ocasionando a diminuindo a formação de O₂⁻ e conseqüentemente reduzindo a duração da fase inflamatória do processo de reparo.^{18,21,22} Essa redução das ERO pela LTBP descritas na literatura, também pode estar associada a um mecanismo de reabsorção mitocondrial, sugerindo que o O₂⁻ pode ser uma fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa do difosfato de adenosina (ADP) em trifosfato de adenosina (ATP).^{23,24} Em adição, outros estudos descrevem que a LTBP influencia diretamente nos níveis do estresse oxidativo cutâneo, através da alteração das enzimas antioxidantes e da NOS, alterando a produção de ERO como o peroxinitrito (OONO), que é um forte oxidante com potencial para destruir componentes celulares críticos.^{17,17,21,22} Alguns estudos destacam ainda que possivelmente haja uma relação dose

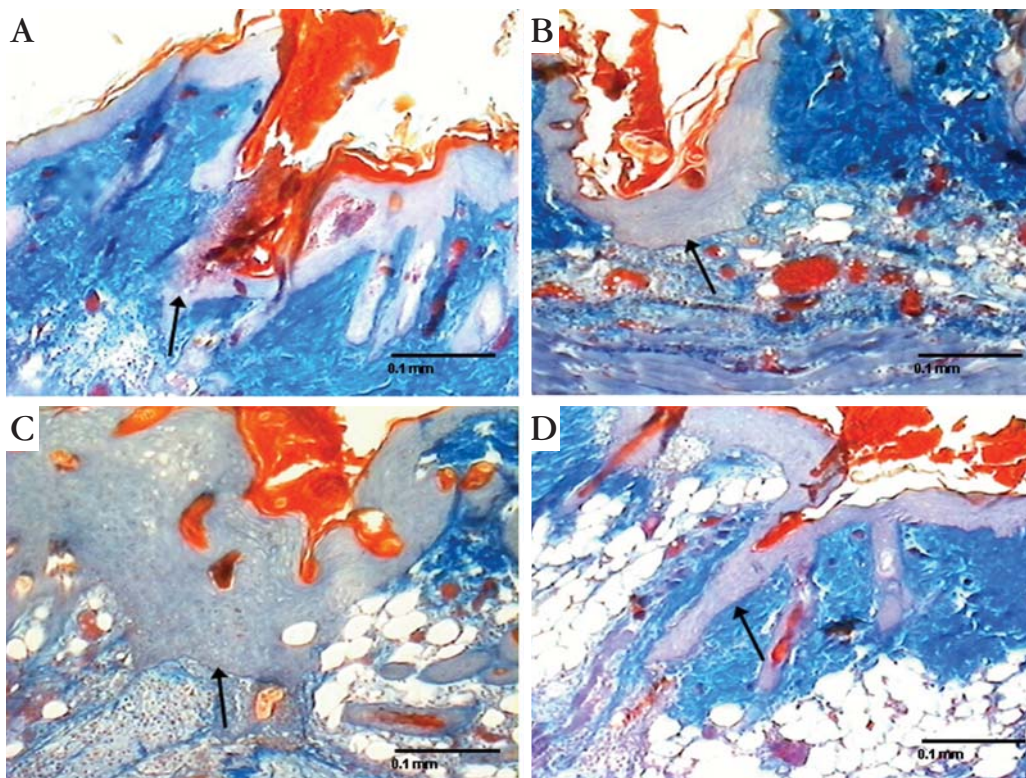
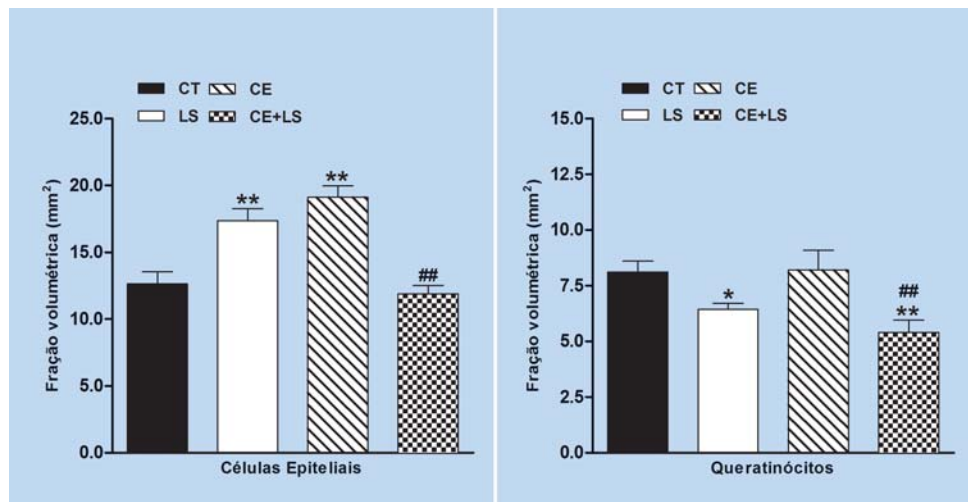


FIGURA 1: Montagem de fotomicrografia de feridas cutâneas de camundongos nos grupos controle (CT, A), laserterapia He-Ne (LS, B), tratado com celecoxibe (CE, C) e tratado com terapia combinada (CE+LS, D). As setas mostram o grau de reepitelização nas feridas cutâneas de todos os grupos (Tricromio de Masson, escala de barra: 0,1 mm)

Montagem de fotomicrografia de feridas cutâneas de camundongos



Determinação da fração volumétrica (mm²) de células epiteliais (A) e de queratinócitos (B) em pele de camundongos no terceiro dia de pós-operatório

GRÁFICO 1: Determinação da fração volumétrica (mm²) de células epiteliais A. e de queratinócitos B. em pele de camundongos no 3º dia de pós-operatório nos grupos controle (CT), laserterapia He-Ne (LS), tratado com celecoxibe (CE) e tratado com terapia combinada (CE+LS). Dados expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de Mann-Witney U para nas variáveis não-paramétricas. Sendo * p < 0,05 ** p < 0,01 vs. CT e ## p < 0,01 vs. LS e CE

e tempo-dependente da LTBP sobre a produção de ERO e radicais livres no tecido cutâneo.²¹⁻²³ Segundo Karu et al.^{17,24} e outros autores²⁰⁻²³ a exposição da LTBP estimula uma atividade eletroquímica mitocondrial extra e um concomitante aumento na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), além do aumento na concentração intracelular de cálcio (Ca⁺²), exercendo efeitos sobre a sinalização celular aumentando a atividade da NOS nas células endoteliais, o que favoreceria uma citoproteção aos danos ocasionados pela lipoperoxidação induzida pela LTBP.¹⁴⁻¹⁶

Adicionalmente, investigações recentes têm mostrado que a isoforma induzível do óxido nítrico (iNOS), um pequeno radical livre formado do aminoácido L-arginina, participa da primeira fase da cicatrização de feridas, através das células inflamatórias, principalmente os monócitos: neutrófilos e leucócitos presentes no processo de cicatrização cutânea.^{3,5,17,20-24} Também é descrito que o óxido nítrico (ON) produzido pela ativação da enzima iNOS nos monócitos, participa da sinalização para deposição de tecido de granulação, de colágeno, e para contração da ferida (formação do botão cicatricial) por vias distintas em modelos animais de cicatrização de feridas.^{3,14,15,17,21,24} Alguns autores mostram ainda efeitos bioestimulatórios da LTBP sobre as citocinas inflamatórias, através da modulação da expressão gênica de vários fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon gama (IFN-γ), os quais também estão potencialmente envolvidos no processo cicatricial de feridas cutâneas.^{24,25} Esses efeitos de regulação do estresse oxidativo cutâneo, de biomodulação das citocinas inflamatórias e fatores de crescimento pode-

riam estar relacionados com os achados histológicos observados neste estudo, em relação ao tratamento isolado de LTBP (He-Ne).

No grupo tratado isoladamente com inibidor da COX₂ os resultados mostraram um acentuado aumento de células epiteliais nas feridas cutâneas sem alterações nos queratinócitos (Gráfico 1A e 1B). Esses efeitos podem ter ocorrido devido à redução na formação local das PGs produzidas pelos AINES clássicos, além do importante papel dos AINES em alterar a biodisponibilidade do NO, principalmente os inibidores seletivos da COX₂^{2,4-10} o que poderia ter promovido o acelerado aumento da reepitelização, mas com consequente déficit na organização do botão cicatricial observado nos cortes histológicos e apresentado na Fig. 1C. Todavia, acredita-se que tanto a COX₁ como a COX₂ são mediadores-chave da cicatrização de feridas cutâneas, embora, a COX₁ torna-se importante somente quando a COX₂ está prejudicada.^{5,6,9,10} Outros estudos mostram também que a inibição da COX-1 e COX-2 simultaneamente, pode causar um aumento compensatório no mRNA de COX e de NOS no tecido de reparação, sugerindo papéis distintos e importantes para as diferentes isoformas de COX e NOS durante a cicatrização de feridas cutâneas regular e com déficit.^{6,8,14}

Já a combinação dos tratamentos ICOX₂ com a LTBP (He-Ne) promoveu uma redução da fração volumétrica de queratinócitos, o qual poderia estar associado ao efeito da LTBP (He-Ne) em regular a expressão e síntese das citocinas inflamatórias envolvidas no processo de reparo, uma vez que os fatores de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e de queratinócitos (KGF) aceleram a diferenciação celular do tecido de granulação.^{14,21-23,25} No entanto, essa combinação de tratamentos não

alterou a reepitelização de feridas cutânea em camundongos, porém especula-se que a ICOX favorece a bioestimulação da fase inflamatória promovida pela LTBP (He-Ne), a qual está caracterizada neste estudo pela adiantada contração da ferida incisional com melhora na organização do botão cicatricial, conforme demonstrado na figura 1D e no gráfico 1.

CONCLUSÃO

A combinação da laserterapia He-Ne com a ICOX₂ foi capaz de regular os efeitos bioestimulatórios de ambos os tratamentos isolados, apresentando um aspecto histomorfofuncional cutâneo mais acelerado comparado ao processo inato com melhor arranjo das estruturas epiteliais e hipodérmicas, conjugado com acelerado e organizado processo de reparo. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos da LTBP e da ICOX₂ nos níveis de regeneração e reparo cutâneo. □

REFERÊNCIAS

- Rocha Jr AM, Vieira BJ, de Andrade LCF, Aarestrup FM. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contributions of in vitro and in vitro experimental studies. *J Vasc Bras*. 2007;6:258-66.
- Gongalves WL, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JG, et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:877-84.
- Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*. 2002;183:406-12.
- Clark RAF. Mechanisms of cutaneous wound repair. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen MD, editors. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill; 1993. p. 473-86.
- Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest*. 2002;82:1503-13.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX1, COX2, and COX3 and the future of chronic inflammatory disease. *Lancet*. 2000;355:646-8.
- Amadeu TP, Costa AMA. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Patol*. 2006;33:465-73.
- Kampfer H, Brautigam L, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank F. Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *J Invest Dermatol*. 2003;120:880-90.
- Muscará MN, McKnight W, Asfaha S, Wallace JL. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol*. 2000;129:681-6.
- Cahill RA, Sheehan KM, Scanlon RW, Murray FE, Kay EW, Redmond HP. Effects of a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor on colonic anastomotic and skin wound integrity. *Br J Surg*. 2004;91:1613-8.
- Rocha Jr AM, Oliveira RG, Farias RE, de Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006;81:150-6.
- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg*. 2004;22:199-204.
- Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Noguchi K, Ishikawa I. Er: YAG laser irradiation increases prostaglandin E production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2005;40:182-6.
- Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22:141-50.
- Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*. 2005;31:334-40.
- Maiya GA, Kumar P, Rao L. effects of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:187-90.
- Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005;36:307-14.
- Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA. Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Rev Bras Fisioter*. 2009;13:281-7.
- de Araújo CE, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TM. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86:87-96.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA, Belchior ACG, Silva IS. Analysis of the influence of low-power He-Ne laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21:177-83.
- Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21:165-70.
- Mileva M, Bakalova R, Zlateva G. Low-intensity laser irradiation does not affect the oxidative stress in experimental cataract. *Medical Laser Application*. 2004;19:150-4.
- Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, et al. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers Surg Med*. 2005;37:293-300.
- Karu TI, Afanas'eva NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk*. 1995;342:693-5.
- Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingival. *Lasers Med Sci*. 2008;23:331-5.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Cíntia Helena Santuzzi

R. Miltbor de Oliveira Fernandes - 50

Ap. 404 Bloco A Bairro: Jardim Camburi

29090760 Vitória - SP, Brasil

Celular: 27 9944 1177 Fone (Alt.)

Email: csantuzzi@terra.com.br

Como citar este artigo/How to cite this article: Santuzzi CH, Buss HF, Pedrosa DF, Freire MOV, Nogueira BV, Gonçalves WLS. Uso combinado da laserterapia de baixa potência e da inibição da ciclooxigenase-2 na reepitelização de ferida incisional em pele de camundongos: um estudo pré-clínico. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):278-83.