

Efeito da terapia LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo

Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira, Renata Amadei Nicolau*, Marco Antonio de Oliveira, Davidson Ribeiro Costa, Antonio Carlos Guimarães Prianti Júnior

Resumo **Introdução:** O *diabetes mellitus* é uma condição sistêmica que pode causar retardo da resposta tecidual frente a uma lesão. Diversos estudos têm apontado o laser como importante ferramenta terapêutica para o auxílio do processo de reparo tecidual. Contudo, poucos estudos foram realizados com o emprego de LED (*Light Emitting Diode*). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da terapia com LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo. **Métodos:** Para tal, foi realizada a indução de *diabetes* experimental em 20 ratos machos (Wistar), com administração de 40mg/kg, por via endovenosa, de mono-hidrato de aloxana diluído em solução tampão. Após 14 dias, os animais foram submetidos à incisão tecidual na região dorsal, seguida de sutura e divididos em grupo-controle (GI e GIII, 3 e 7 dias pós-lesão, respectivamente), e grupo-tratado com LED (GII e GIV, 3 e 7 dias pós-lesão, respectivamente). Os animais do grupo tratado ($n = 10$) foram irradiados de forma transcutânea, em duas sessões (30 minutos e 48 horas pós-lesão). **Resultados:** O número de fibroblastos foi significativamente maior no GIV em relação ao GIII. **Conclusão:** Considerando o aumento do número de fibroblastos (análise quantitativa) e o adequado fechamento da lesão (análise qualitativa), pode-se concluir que houve um efeito positivo da terapia LED na região do infravermelho próximo sobre o processo de reparo, após 7 dias de lesão tecidual em animais diabéticos (GIV).

Palavras-chave LED, Reparo tecidual, *Diabetes mellitus*.

Low level LED therapy ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) effect on epithelial tissue of diabetic rats during repairing process

Abstract **Introduction:** *Diabetes mellitus* is a systemic condition that can cause delayed tissue response to injury. Several studies have demonstrated laser therapy as an important tool to aid the process of tissue repair. However, few studies have been conducted with the use of LED (*Light Emitting Diode*). **Objective:** The objective of this study was to analyze the low intensity LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) therapy effect on epithelial tissue of diabetic rats in the healing process. **Methods:** The induction of experimental diabetes was performed in 20 male rats (Wistar) with the intravenous administration of 40mg/kg of alloxan monohydrate diluted in buffer solution. After 14 days the animals underwent tissue incision in the dorsal region, followed by suture, and divided into control groups (GI and GIII, 3 and 7 days post-injury, respectively) and groups treated with LED (GII and GIV, 3 and 7 days post-injury, respectively). The treated groups ($n = 10$) were irradiated transcutaneously, in two sessions (30 minutes, 48 hours post-injury). **Results:** The number of fibroblasts was significantly higher in GIV compared to GIII. **Conclusion:** Considering the increase of fibroblasts (quantitative analysis) and appropriate closing of the lesion (qualitative analysis), we conclude that LED therapy in the near infrared region causes a positive effect on healing process after 7 days in tissue injury in diabetic animals (GIV).

Keywords LED, Rissue repair, *Diabetes mellitus*.

Introdução

O *Diabetes mellitus* (DM) consiste em uma desordem metabólica complexa cujos componentes causam vários efeitos diretos e indiretos no reparo de lesões teciduais (Valero *et al.*, 2007). O desenvolvimento do DM pode ocorrer a partir de uma alteração pancreática, que leve a menor secreção de insulina (Silva *et al.*, 2002). Há basicamente dois tipos de *diabetes* tipo 1 (insulinodependente) e tipo 2 (não insulinodependente). O DM tipo 1 pode ser induzido experimentalmente por meio de drogas diabogênicas como a estreptozotocina (Al-Watban e Andres, 2006), o aloxana (Dall-Agnol *et al.*, 2009), entre outras (Chicarelli, 2000; Zimmet *et al.*, 2003). O DM tem sido associado clinicamente e experimentalmente a um processo cicatricial mais demorado. Estudos realizados apoiam as evidências de disfunção dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, com uma fase inflamatória prolongada, decréscimo na biossíntese de colágeno e glicosaminoglicanas, resultando no retardo da formação do tecido de granulação (Almeida *et al.*, 2002). As falhas mais importantes do reparo ocorrem em estágios iniciais de cicatrização, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno. Diversos fatores locais e sistêmicos interferem e retardam a cicatrização e, por isso, a reparação tecidual tem merecido atenção em vários estudos, em busca de métodos terapêuticos que possam solucionar ou minimizar as falhas no processo (Almeida *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Meireles *et al.*, 2009).

A terapia com laser de baixa intensidade (TLBI) tem sido sugerida como opção terapêutica efetiva para modulação da dor e favorecimento do processo de reparação cutânea (Carvalho *et al.*, 2010; Dall-Agnol *et al.*, 2009; Rabelo *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009). No entanto, as alterações histológicas e bioquímicas induzidas pela TLBI e do mecanismo pelo qual o laser facilita a cicatrização de feridas resistentes, como as feridas diabéticas e reparação dos tecidos, são pouco compreendidas (Carvalho *et al.*, 2010; Maiya *et al.*, 2005).

Atualmente, têm sido realizados estudos empregando o LED (*Light Emitting Diode*) de baixa intensidade como fonte de emissão de fótons, como uma alternativa à TLBI no reparo de feridas, alívio da dor e outras condições patológicas (Al-Watban e Andres, 2006; Weiss *et al.*, 2005). Pela sua durabilidade e baixo custo, os aparelhos de LED têm se tornado uma alternativa aos lasers na área da saúde (Bispo, 2007). Os fótons emitidos por equipamentos de LED possuem estreita banda de emissão (± 20 nm), potência de saída próxima à emitida por lasers de baixa intensidade (20-100 mW).

Estudos recentes indicam que a terapia LED de baixa intensidade exerce efeito não térmico sobre a pele (Queiroz *et al.*, 2008). Segundo autores, a radiação eletromagnética emitida por um LED pode ser absorvida pelo citocromo c oxidase, presente nas mitocôndrias das células eucariotas. Essa interação luz-tecido pode levar ao aumento da atividade metabólica celular, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno (Karu, 2003). Devido à recente introdução dessa modalidade terapêutica, poucos estudos foram realizados envolvendo terapia LED com organismos diabéticos (Dall-Agnol *et al.*, 2009). Considerando a dificuldade de resposta tecidual em indivíduos diabéticos, estudos devem ser realizados visando a observar efeitos promovidos pela terapia LED. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da terapia LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo.

Métodos

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba e obteve aprovação, sob o protocolo H013/CEP/2009, seguindo os princípios éticos da experimentação animal de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

Foram estudados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, da linhagem Wistar, pesando 250 ± 20 g. Os animais foram distribuídos e acondicionados aleatoriamente em caixas específicas para ratos com alimentação e água “*ad libitum*”.

A indução do *diabetes* experimental foi realizada via administração de 40 mg/kg, por via endovenosa (veia caudal), de mono-hidrato de aloxana (SIGMA-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA, lote 083K2511), diluído em solução tampão citrato (Dall-Agnol *et al.*, 2009).

Para a indução do diabetes, não foi oferecido alimento sólido aos animais durante 2 horas antes do procedimento. Os animais foram pesados anestesiados com cloridrato de cetamina a 10%, na dose de 1 g/kg (0,1 mL/100 g) de peso corpóreo, associado ao cloridrato de xilazina a 2%, na dose de 0,02 g/kg (0,1 mL/100 g) de peso corpóreo, via intramuscular (Dall-Agnol *et al.*, 2009). As drogas anestésicas foram aplicadas, simultaneamente, com a utilização de seringa de 1 mL de capacidade e agulhas de $8 \times 0,30$ mm. Quinze minutos após a indução da anestesia a solução de aloxana foi administrada lentamente, por via endovenosa, pela veia central da cauda.

Após 7 dias os animais foram anestesiados (Dall-Agnol *et al.*, 2009) e receberam nova injeção da

solução de aloxana. Aos 14 dias da primeira indução, os animais tiveram a glicemia monitorada, empregando-se o teste de glicemia capilar (Accu-Chek - Active), com jejum de 2 horas. Os animais que se encontravam com glicemia superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos (Al-Watban, 2009; Al-Watban e Andres, 2006; Al-Watban *et al.*, 2007, 2009). Os animais diabéticos foram anestesiados e tiveram a região dorsal direita tricotomizada. Vinte e quatro horas após a depilação, os animais foram anestesiados (conforme supracitado) e submetidos à incisão da pele, na região dorsal, com comprimento de 3 cm e profundidade aproximada de 1 mm. As bordas da ferida foram imediatamente suturadas com fio três pontos simples, empregando fio de seda 4-0 (1/2, 1,7 cm, agulha triangular, Technew®). Os 20 animais diabéticos foram divididos em quatro grupos (n = 5): GI (grupo-controle, sacrificado aos 3 dias pós-lesão), GII (grupo-irradiado, sacrificado aos 3 dias pós-lesão), GIII (grupo-controle, sacrificado aos 7 dias pós-lesão), GIV (grupo-irradiado, sacrificado aos 7 dias pós-lesão).

Os animais dos grupos-controle (GI e GIII) receberam simulação de tratamento com o equipamento de LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) desligado. Os animais dos grupos tratados (GII e GIV) foram irradiados de forma transcutânea com 6 J/cm²/ponto (30 mW, 157 segundos, área do feixe 0,5 cm², quatro pontos de irradiação/sessão (total 24 J/cm²), em duas sessões, sendo a primeira 30 minutos após a cirurgia e a segunda após 48 horas. Após o 3º (animais do GI e GII) e 7º dia pós-lesão (animais do GIII e GIV), foram submetidos ao procedimento de eutanásia (2º grupo controle e tratado, n = 10). A amostra de tecido foi dividida em duas partes, sendo a primeira (2 cm) encaminhada para análise histológica e a segunda (1 cm) para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para análise histológica o tecido removido foi fixado em formaldeído a 10%. Para a análise por MEV, as amostras foram acondicionadas em glutaraldeído a 2,5%.

Processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises qualitativa e quantitativa

Foram obtidas imagens de todas as amostras, dos diferentes grupos (GI a GIV), por meio de MEV. Para tal, cada amostra foi retirada do recipiente em que estava fixada (glutaraldeído 2,5%) e reduzida a um fragmento com dimensões aproximadas de 0,7 cm² de área \times 1 mm de espessura. As amostras foram secas, metalizadas com ouro e resfriadas a uma temperatura de -30 °C sob vácuo. A partir das imagens de MEV, a área de reparo tecidual foi analisada qualitativa e quantitativamente. A análise qualitativa buscou observar o nível de reparo na

área de lesão, considerando-se a extensão da região de lesão, presença ou não de anexos cutâneos e possíveis anormalidades no processo cicatricial. A análise quantitativa das imagens foi realizada com o auxílio do programa ImageJ 1,43s. As medidas foram realizadas nas imagens determinando a profundidade e área (mm²) da lesão. Os dados foram submetidos à análise estatística, considerando-se um nível de significância de 5% (p < 0,05).

Processamento para microscopia óptica (MO) e análise qualitativa e quantitativa

A porção distal da lesão (1 cm) de cada amostra foi fixada em formol a 10%. De cada amostra foram obtidos 8 cortes semi-seriados (5 μ m), com o auxílio de um micrótomo modelo Spencer 820. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina. As lâminas histológicas foram analisadas por MO após a digitalização de imagens. As fotomicrografias foram obtidas em aumento de 100 vezes e armazenadas no formato JPEG (*Joint Photographic Experts Group*). A análise qualitativa buscou a observação da área de reparo tecidual, identificando presença de espaços intersticiais (sugestivo de edema), concentração de células inflamatórias, presença de recobrimento epitelial com presença de estrato córneo, anexos cutâneos etc. Para a análise quantitativa das células, foi utilizado o programa ImageJ 1,43s. Empregando-se o *Plugin cell counter*, foi realizada a contagem de fibroblastos e células inflamatórias. A análise da área da lesão foi efetuada em aumento de 10x, empregando-se o recurso de desenho livre.

Análise estatística

Para a análise estatística, foi empregado o programa GraphPad InStat V. 2.05. O nível de significância adotado foi de 5% (p < 0.05). A análise de variância, complementada com o pós-teste de Bonferroni. Os testes estatísticos foram aplicados para comparar a área e a profundidade da lesão, o número de células inflamatórias e o número de fibroblastos, entre os grupos-controle e LED, em ambos os tempos experimentais. Para a análise da área de colágeno, foi empregado o teste t de Student pareado para a comparação entre o GIII e o GIV.

Resultados

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) - análise qualitativa

As imagens de MEV, aos 3 dias pós-lesão, GI e GII (Figuras 1A e B), permitiram observar a presença de área de lesão, além de conformação da deposição

de matriz de colágeno (maior ou menor densidade e presença de espaços intersticiais). A presença de área de lesão é evidenciada na Figura 1, pela descontinuidade do tecido (área tracejada) abrangendo epiderme (Ep) e derme (Dr) em ambos os grupos. O GI apresenta distanciamento dos bordos ligeiramente maior que do GII.

Aos 7 dias pós-lesão, não há completo selamento tecidual nos animais do GIII (Figura 2A), contudo é possível observar a ausência de descontinuidade do tecido no grupo tratado GIV (Figura 2B). Em maior aumento, pode-se evidenciar a presença de tecido cicatricial de elevada densidade no GIV, quando comparado ao GIII (Figuras 3A e B).

Análise quantitativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Não foram observadas diferenças significativas na área de lesão entre o GI e GIII (3 e 7 dias pós-cirurgia). O GII apresentou área de lesão significativamente maior

($p = 0,0492$) que do GI. O mesmo não foi observado entre GIII e GIV ($p > 0,05$). A área de lesão do GIV foi significativamente menor (28,12%, $p = 0,0317$) que o GII (Figura 4).

Foi observada diferença significativa ($p = 0,0114$) na profundidade da lesão entre o GI e GIII. Não houve diferença significativa entre o GI e o GII ($p = 0,0838$). Não foi observada diferença significativa entre o GIII e o GIV ($p = 0,2476$). A profundidade da lesão no GIII foi significativamente menor (50,54%, $p = 0,004$) que o GII. No GIV, a profundidade da lesão foi significativamente menor (56,5%, $p = 0,0159$) que no GII (Figura 5).

Análise histológica qualitativa

Na análise histológica qualitativa (Figura 6), pode-se observar, no GI e GII, resposta inflamatória e descontinuidade do tecido cutâneo, devido à lesão seguida de cicatrização por primeira intenção. Nos animais do GI, pode-se observar resposta inflamatória

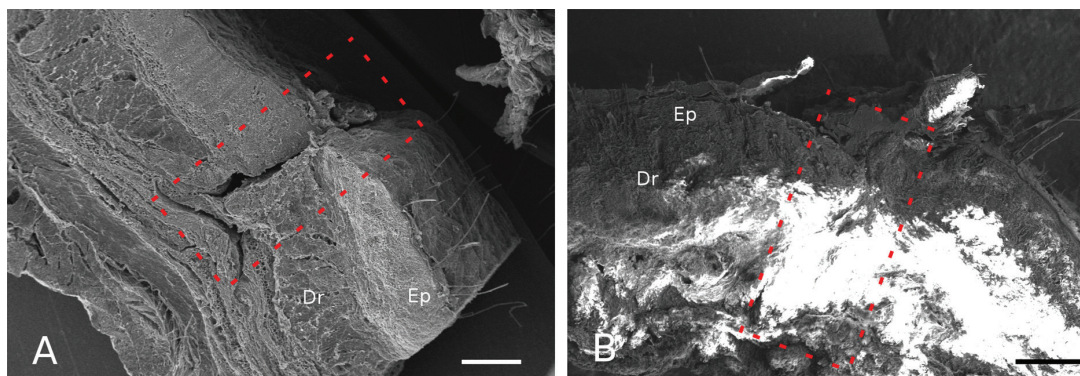


Figura 1. MEV de amostras de 3 dias pós-lesão de animal do GI (A) e GII (B). Em evidência, observa-se área cicatricial abrangendo epiderme e derme (área tracejada). Ep- Epiderme. Dr- Derme. Escala: 1 mm.

Figure 1. SEM 3 days post-injury of GI (A) and GII (B) samples. In evidence, it is shown a healing area covering epidermis and dermis (hatched area). Ep-Epidermis. Dr-Dermis. Scale: 1 mm.

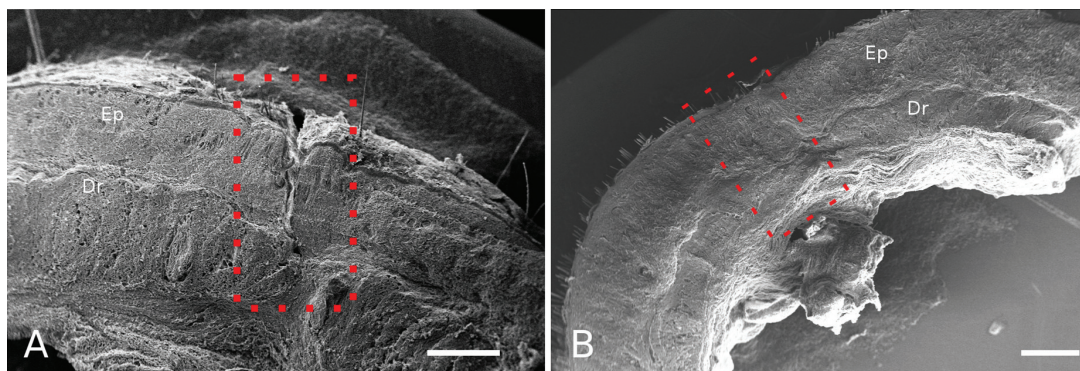


Figura 2. MEV de amostras de 7 dias pós-lesão de animal do GIII (A) e GIV (B). Em evidência, observa-se área cicatricial abrangendo epiderme e derme (área tracejada). Ep- Epiderme. Dr- Derme. Escala: 1 mm.

Figure 2. SEM 7 days post-injury of GIII (A) and GIV (B) samples. In evidence, it is shown a healing area covering epidermis and dermis (hatched area). Ep-Epidermis. Dr-Dermis. Scale: 1 mm.

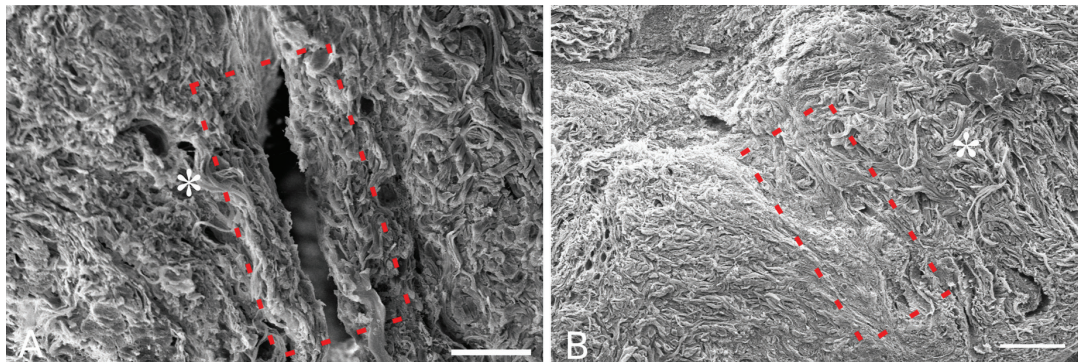


Figura 3. MEV de amostras de 7 dias pós-lesão de animal do GIII (A) e GIV (B). Em evidência, observa-se parte da área de reparo (tracejado), com presença de fibras colágenas (*). Escala: 100 μ m.

Figure 3. SEM 7 days post-injury of GIII (A) and GIV (B) samples. In evidence, part of the healing area (dashed), with the presence of collagen fibers (*). Scale: 100 μ m.

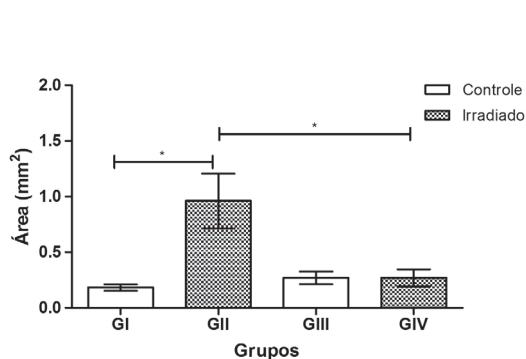


Figura 4. Área da lesão de animais dos grupos controle 3 (GI) e 7 (GIII) dias pós-lesão e de animais dos grupos irradiado 3 (GII) e 7 dias pós-lesão (GIV). Dados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

Figure 4. Lesion area of the control groups 3 (GI) and 7 (GIII) days post-injury and irradiated groups 3 (GII) and 7 (GIV) days post-injury. Data expressed as mean \pm standard error. * $p < 0.05$.

moderada em comparação ao GII, no qual foi observada intensa resposta inflamatória, ou seja, espaçamento intersticial, células inflamatórias e congestão de vasos. Não são observadas diferenças qualitativas quanto ao processo de reparo entre o GIII e GIV (anexos cutâneos, presença de estrato córneo, área de cicatriz etc.). Esses dados sugerem maior intensidade de resposta no grupo irradiado no início do processo reparo tecidual. No entanto, essa maior atividade celular não foi observada em 7 dias pós-lesão, comparando-se o GIII e GIV. No GIV, observa-se área menos evidente de cicatriz.

Análise histomorfométrica

A partir das imagens obtidas (Figura 6) na microscopia óptica, foram realizadas a contagem de células inflamatórias, fibroblastos e medida da área de colágeno.

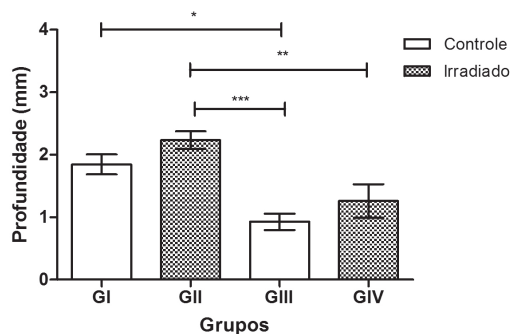


Figura 5. Profundidade da lesão de animais dos grupos controle 3 (GI) e 7 (GIII) dias pós-lesão e de animais dos grupos irradiado 3 (GII) e 7 dias pós-lesão (GIV). Dados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figure 5. Lesion depth of control groups 3 (GI) and 7 (GIII) days post-injury and irradiated groups 3 (GII) and 7 (GIV) days post-injury. Data expressed as mean \pm standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Não foram observadas diferenças significativas na contagem de células inflamatórias entre os grupos 3 e 7 dias pós-lesão (GI, GII, GIII e GIV) (Figura 7).

Não foi observada diferença significativa no número de fibroblastos entre o GI e o GII (Figura 8). Na análise histológica quantitativa, pode-se observar um número de fibroblastos significativamente maior no GIV ($p = 0,0179$) em relação ao GIII.

Não foi possível a análise da área de colágeno entre o GI e GII, devido à presença de artefatos do processo histológico, que induziam a erros metodológicos na análise semiautomática de área. Não houve diferença significativa da área de colágeno entre o GIII e o GIV (Figura 9).

Discussão

A presença do DM pode levar a um comprometimento da cicatrização das feridas operatórias. Acredita-se

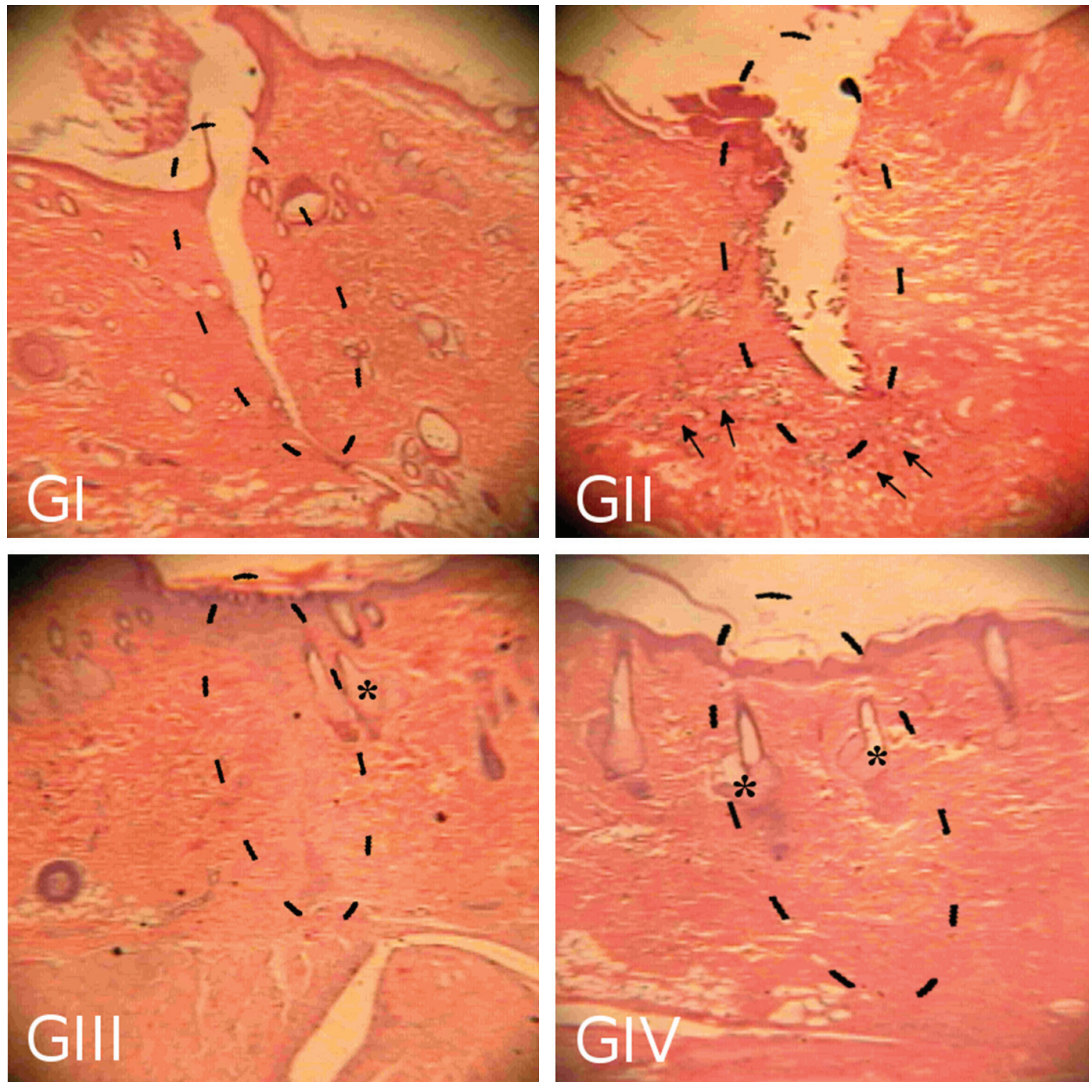


Figura 6. Fotomicrografias por microscopia óptica da zona de lesão. Presença de anexo cutâneo (*) na região de incisão (---). Observa-se a área de lesão em processo de reparo em exemplos do grupo controle 3 (GI) e 7 (GIII) dias pós-lesão e do grupo irradiado 3 (GII) e 7 dias pós-lesão (GIV). Região com alta concentração de células inflamatórias (seta). H&E x100.

Figure 6. Optical microscope photomicrographs of the lesion zone. Presence of cutaneous annex (*) in the incision area (---). The area of injury repairing process is observed in examples in the control group 3 (GI) and 7 (GIII) days post-injury and the irradiated group 3 (GII) and 7 (GIV) days post-injury. Region with a high concentration of inflammatory cells (arrow). H & E x100.

que a redução ou retardo no desenvolvimento da resistência da sutura seja uma causa potencial das complicações cirúrgicas (Al-Watban e Andres, 2006; Diamantino *et al.*, 2011). O reparo tecidual em indivíduos diabéticos apresenta fatores limitantes como deficiência da microcirculação periférica, com consequente redução do aporte energético e nutricional (Al-Watban, 2009; Al-Watban e Andres, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Dall-Agnol *et al.*, 2009). A eficácia da fototerapia na aceleração da reparação de feridas cutâneas é amplamente conhecida (Walker *et al.*, 2000). A radiação eletromagnética,

coerente e não-coerente, aumenta, significativamente, a neovascularização em tecido lesionado, acelerando o processo de reparo e diminuindo a área de necrose, indicando um aumento do fluxo sanguíneo em locais de lesão (Kubota, 2002; Prado *et al.*, 2006; Schindl *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos relacionados à terapia LED têm estudado o reparo de lesões cutâneas por segunda intenção (Dall-Agnol *et al.*, 2009). Considerando-se que a fototerapia na região do infravermelho próximo é indicada para a otimização do reparo tecidual ósseo (Diamantino *et al.*, 2011), e que em organismos

diabéticos a deiscência de suturas pode comprometer esse reparo, a análise do tecido epitelial é salutar. Assim, o presente estudo visou a avaliar o processo de reparo em incisão cirúrgica, para verificar possíveis influências da terapia com LED sobre o processo de reparo cutâneo por primeira intenção.

A terapia LED, como coadjuvante no processo de reparo ósseo, é realizada de modo transcutâneo,

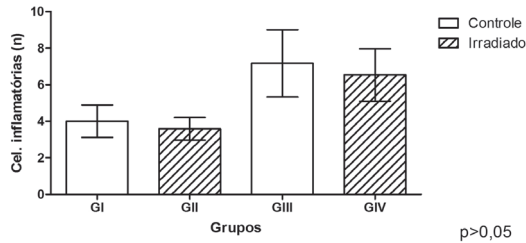


Figura 7. Contagem de células inflamatórias de animais dos grupos controle 3 (GI) e 7 (GIII) dias pós-lesão e de animais dos grupos irradiado 3 (GII) e 7 dias pós-lesão (GIV). Dados expressos em média \pm erro padrão. $p > 0,05$.

Figure 7. Inflammatory cells count of the control groups 3 (GI) and 7 (GIII) days post-injury and irradiated groups 3 (GII) and 7 (GIV) days post-injury. Data expressed as mean \pm standard error: $p > 0.05$.

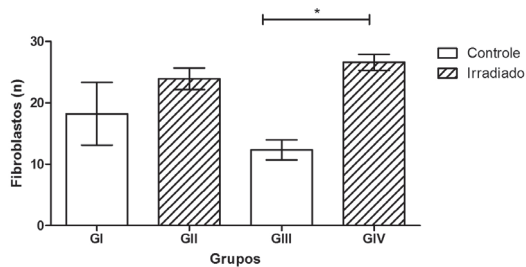


Figura 8. Contagem do número de fibroblastos de animais dos grupos controle 3 (GI) e 7 (GIII) dias pós-lesão e de animais dos grupos irradiado 3 (GII) e 7 dias pós-lesão (GIV). Dados expressos em média \pm erro padrão. $*p < 0,05$.

Figure 8. Number of fibroblasts count in the control groups 3 (GI) and 7 (GIII) days post-injury and irradiated groups 3 (GII) and 7 (GIV) days post-injury. Data expressed as mean \pm standard error. $*p < 0.05$.

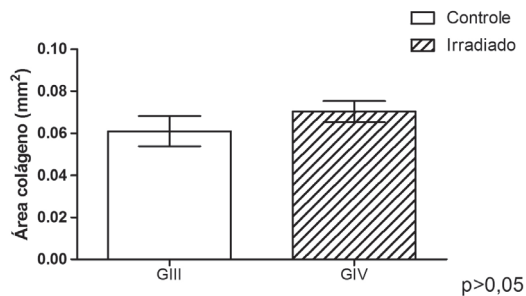


Figura 9. Área de colágeno de animais do grupo controle 7 dias pós-lesão (GIII) e de animais do grupo irradiado 7 dias pós-lesão (GIV). Dados expressos em média \pm erro padrão. $p > 0,05$.

Figure 9. Collagen area in the control group 7 days post-injury (GIII) and the group of animals irradiated 7 days post-injury (GIV). Data expressed as mean \pm standard error: $p > 0.05$.

o que torna necessário o contato da radiação eletromagnética com a pele. Estudos sobre a cicatrização cutânea foram realizados com LED na região do vermelho ($\lambda = 640 \pm 20$ nm) (Carvalho *et al.*, 2010; Dall-Agnol *et al.*, 2000); No entanto, não foram observados estudos empregando LED na região do infravermelho próximo ($\lambda = 945 \pm 20$ nm).

Foi possível observar um menor distanciamento entre os bordos da lesão e uma maior densidade da área de tecido conjuntivo na derme nos animais do GII, quando comparados aos animais do GI. Observou-se que a área de lesão do GIV apresentou-se significativamente menor em relação às fases iniciais do processo de reparo (GII). Ainda que a área de lesão no GII, no início do processo, tenha sido mais evidente, essa diferença não causou retardo no processo de reparo. A área de lesão no grupo irradiado pode estar relacionada com maior celularidade (número de fibroblastos), observada na análise quantitativa. Segundo Kubota (2002), Prado *et al.* (2006), Schindl *et al.* (2002) e Yu *et al.* (2006), a fototerapia pode aumentar significativamente a neovascularização e o fluxo sanguíneo em locais de lesão.

Verificou-se que o GIV apresentou um total selamento e maior densidade do tecido conjuntivo quando comparado ao GIII (presença de descontinuidade e espaçamento entre os bordos da lesão), sugerindo benefícios da fototerapia no processo de reparo. De forma contrária, provavelmente pode ter intensificado a atividade celular na fase inflamatória, culminando e aumentando a síntese de colágeno, sugerida pela alta densidade do tecido. Estudos realizados por Casalechi *et al.* (2009) e Dall-Agnol *et al.* (2009) verificaram respostas teciduais semelhantes em 3 e 7 dias pós-lesão, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dados apresentados por Carvalho *et al.* (2010), nos quais o reparo tecidual (incisão cutânea) foi otimizado em animais normoglicêmicos, pós-terapia LED. Segundo revisão sistemática, realizada por Ferreira e Nicolau (2011), a condição de diabetes sobre o reparo tecidual tem sido reportada em vários estudos com animais. Essa condição sistêmica modifica padrões fisiopatológicos do processo de cicatrização (Al-Watban e Andres, 2006; Chicarelli, 2000; Silva *et al.*, 2002).

A redução da microcirculação periférica, dos níveis de pressão de O_2 , da proliferação celular e da resposta imune são condições observadas em organismos diabéticos. Ratos com DM induzida por aloxana produzem menos tecido de granulação do que ratos normoglicêmicos. As cicatrizes em tais animais apresentam fraca resistência mecânica, e essas alterações têm sido atribuídas a alterações bioquímicas da ferida, causada pela deficiência de

insulina (Stadler *et al.*, 2001). Klebanov *et al.* (2005) estudaram os efeitos da luz coerente (laser) e não coerente (LED) sobre as feridas cutâneas de ratos e demonstraram que ambas estimularam a transição da fase inflamatória para a proliferativa.

A irradiação com laser na região vermelha do espectro eletromagnético diminui a quantidade de células inflamatórias, também exerce efeito estimulador sobre TGF- α (*Tumor Growth Factor alpha*), e PDGF (*Platelet-derived growth factor*), sendo que o estímulo a esses fatores de crescimento relaciona-se diretamente ao processo de reparo (Albertini *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2007; Piva *et al.*, 2011). Klebanov *et al.* (2005) estudaram o efeito da luz coerente (laser) e não coerente (LED) sobre a atividade funcional do exsudato leucocitário, em feridas cutâneas de ratos. Os autores demonstraram que tanto o laser como o LED estimularam a transição da fase inflamatória para a proliferativa sem diferenças significativas entre elas, concluindo que a coerência não é um fator limitante para que ocorra efeito biológico mediado por luz. Dall-Agnol *et al.* (2009) estudaram o efeito da terapia LED ($\lambda = 640 \pm 20$ nm) sobre o processo de reparo de ferida em animais diabéticos e não-diabéticos. Observaram que as células inflamatórias apresentaram-se significativamente diminuídas nos animais tratados com LED no vermelho, em comparação com animais controle para ambos os grupos. No presente estudo, os grupos irradiados com LED na região do infravermelho ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) não apresentaram diferenças estatísticas, no número de células inflamatórias, em relação aos grupos controles. Esses dados descartam efeitos deletérios pós-irradiação LED. A realização de estudos futuros que abranjam a análise de mediadores químicos e fatores de crescimento pode conduzir à elucidação dos eventos moleculares relacionados aos resultados obtidos.

Segundo Dall-Agnol *et al.* (2009), não foi observada diferença significativa no número total de fibroblastos em seu estudo, apesar de ter sido observado um discreto aumento dessas células na derme superficial e na profunda nos grupos tratados. Em contrapartida, o estudo de Carvalho *et al.* (2010), comparando LED e laser como opção de terapia para o reparo tecidual, mostraram que há um aumento no número de fibroblastos quando comparado a grupos controle aos 7 dias pós-lesão para a terapia LED. De acordo com estudos de Karu (2003), a interação LED-tecido pode levar ao aumento da atividade metabólica celular, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, o que está de acordo com os resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2010) e por nosso grupo no presente estudo.

Assim, considerando o aumento do número de fibroblastos (análise quantitativa) e o adequado fechamento da lesão (análise qualitativa), pode-se concluir que houve um efeito positivo da terapia LED na região do infravermelho próximo sobre o processo de reparo, após 7 dias de lesão tecidual, em animais diabéticos. E ainda, os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir para o estabelecimento de protocolos, visando à prevenção de deiscência de sutura e infecções em fases iniciais de reparo em indivíduos diabéticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e o CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wave lengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*. 2007; 89(1):50-5. PMID:17920925.
- Al-Watban FA. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009; 27(1):127-35. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2406>
- Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006; 24(1):10-6. PMID:16503782.
- Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: A Comparison of different lasers. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007; 25(2):72-7. PMID:17508840.
- Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL, Al-Anize A. Visible lasers were better than invisible lasers in accelerating burn healing on diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009; 27(2):269-72. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2310>.
- Almeida SM, Ferreira RI, Boscolo FN. Influência da irradiação sobre o conteúdo de colágeno, durante a cicatrização, em ratos diabéticos. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2002; 16(4):293-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912002000400003>
- Bispo LB. Diodos emissores de luz: o comprimento de onda e sua importância. *Revista Dentística*. 2007; 7(16):110-3.
- Carvalho PTC, Siqueira JFR, Ferreira JVL, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. *Fisioterapia Brasil*. 2003; 4(4):253-8.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA, Belchior ACG, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic

- rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21(3):177-83. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000300010>
- Carvalho KC, Nicolau RA, Maia ALM, Barja PR, Sá HP, Santo LAE, Rocha GM. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. *ConScientiae Saúde*. 2010; 9(2):179-86.
- Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L Jr, De Paula AM, Pacheco MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24(4):659-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-008-0607-6>
- Chicarelli M. Reparação tecidual em ratos diabéticos submetidos a baixas doses de radiação de elétrons em corpo todo [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas; 2000. 111p.
- Correa F, Martins RABL, Correa JC, Iversen VV, Joenson J, Bjordal JM. Low-level laser therapy (GaAs = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with Lipopolysaccharide-Induced Peritonitis. *Photomedicine end Laser Surgery*. 2007; 25(4):245-9. PMID:17803379.
- Dall-Agnol MAD, Nicolau RA, Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24(6):909-16. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-009-0648-5>
- Diamantino AG, Nicolau RA, Oliveira MA, Espirito-Santo AM. Evaluation of LED therapy at 945 nm on bone repair by micro x-ray fluorescence spectroscopy and scanning electron microscopy. *European Conference on Biomedical Optics*. 2011; 8092:80921S-9.
- Ferreira CLR, Nicolau RA. Diabete experimental em ratos - revisão sistemática. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, Encontro Latino Americano de Pós-Graduação: Anais de trabalhos completos XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; 2011; São José dos Campos. São José dos Campos: Univap Virtual; 2011. v. 1. p. 1-5.
- Karu TI. Cellular mechanisms of low power laser therapy: new questions. In: Simunovic Z. [Lasers in medicine, surgery, urology and veterinary]. Vitgraf: European Medical Laser Association; 2003. p. 79-99
- Klebanov GI, Shuraeva NY, Chichuk TV, Osipov AN, Rudenko TG, Shekhter AB, Vladimirov YA. A comparative study of the effects of laser and light-emitting diode irradiation on the wound healing and functional activity of wound exudate leukocytes. *Biofizika*. 2005; 50(6):1137-44. PMID:16358796.
- Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Medical Science*. 2002; 17(3):143-53. PMID:12181629.
- Maiya GA, Pramod K, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005; 23(2):187-90. PMID:15910184.
- Meireles GCS, Oliveira PC, Moura AP, Santos JN, Pinheiro ALB. A influência do diabetes mellitus tipo 1 na cronologia do reparo de queimaduras. *Revista Eletrônica da Fainor*. 2009; 2(1):77-86.
- Piva JAAC, Abreu EMC, Silva VS, Nicolau RA. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011; 86(5):947-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000500013>
- Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21(4):258-62. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000400013>
- Queiroz LS, Wollmann DER, Nicolau RA, Pacheco MTT. Effect of LED irradiation on microcirculation of auricular mouse. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*. 2008; 62(2):138-42.
- Rabelo SB, Villaverde AGJB, Nicolau RA, Salgado MAC, Melo MS, Pacheco MTT. Comparison between the wound healing at induced diabetic and non diabetic rats after LLLT. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2006; 24:474-9. PMID:16942427.
- Schindl A, Heinze G, Schindl M, Scho HP, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvascular Research*. 2002; 64:240-6. PMID:12204648.
- Silva FRMB, Szpoganicz B, Pizzolatti MG, Willrich MAV, Sousa E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 83(1):33-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00193-9)
- Silva FS, Araújo AR, Chaves MEA. Diodos emissores de luz (LED) como terapia coadjuvante no tratamento de úlceras venosas – relato de caso. *Revista Kinesia*. 2009; 1:18-27.
- Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, Naim JO. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surgery and Medicine*. 2001; 28(3):220-6. PMID:11295756.
- Valero AM, García JCF, Ballester AH, Rueda CL. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal*. 2007; 12:38-43.
- Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surgery and Medicine*. 2000; 26(1):41-7. PMID:10637002.
- Weiss RA, Mcdaniel DH, Geronemus RG, Margaret AW, Karen LB, Munavalli GM, Bellew SG. Clinical experience with Light Emitting Diode (LED) photomodulation. *Dermatology Surgery*. 2005; 31(3):199-205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31926>
- Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Hsu YC, Lui WY, Wu CW. Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2006. 22(2):78-86. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0781.2006.00208.x>
- Zimmet P, Shaw J, Alberti KG. Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: A realistic view. *Diabetic Medicine*. 2003. 20(9):693-702. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.01052.x>

Autores

Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira, Renata Amadei Nicolau*, Marco Antonio de Oliveira, Davidson Ribeiro Costa, Antonio Carlos Guimarães Prianti Júnior

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-000, São José dos Campos, SP, Brasil.

Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira, Renata Amadei Nicolau*, Davidson Ribeiro Costa

Laboratório de Biomodulação Tecidual – BIOTEC, São José dos Campos, SP, Brasil.

Marco Antonio de Oliveira

Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – São José dos Campos, SP, Brasil.

Antonio Carlos Guimarães Prianti Júnior

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia – São José dos Campos, SP, Brasil.