

QUIMIOTAXIA DE MACRÓFAGOS FRENTE A DOIS REGIMES DE ENTREGA DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS

C. L. Santana*, A. P. Souza**, A. M. Deana***, R. A. Prates***, K. P. S. Fernandes***
e C. M. França***

*Biólogo, doutorando, Programa de Pós- Graduação em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde (PPGB), Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brasil

** Graduanda em Biologia, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brasil

*** Docentes do PPGB, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brasil

e-mail: cristianols76@gmail.com

Resumo: O reparo tecidual dos diabéticos é deficiente e pode levar à dificuldade de cicatrização. A laserterapia é uma ferramenta promissora auxiliar no fechamento destas feridas. O objetivo deste trabalho é observar se a mudança no regime de entrega do laser interfere na velocidade do reparo e na quimiotaxia de macrófagos, células fundamentais na regulação desse processo. Para tal foram feitas feridas com *punch* de 8 mm no dorso de ratos diabéticos quimicamente convertidos por injeção intraperitoneal de streptozotocina e posteriormente submetidos a dois regimes de entrega de luz laser $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, $P = 30$ mW com dose única e dose fracionada. Grupos experimentais: (1) grupo controle (GC) - úlcera submetida a tratamento; (2) dose única (GU) - recebeu laserterapia com 4 J/cm^2 , $t = 104$ s; (3) dose fracionada (GF) - recebeu laserterapia de 1 J/cm^2 , $t = 26$ s nos dias 1, 3, 8 e 10, totalizando tratamento de 4 J/cm^2 . As feridas foram fotografadas em todos os dias experimentais e após a eutanásia o material foi processado e realizada a imunohistoquímica para detecção de macrófagos. As duas formas de entrega de energia aceleraram o fechamento da ferida nos primeiros dias, mas isso não acelerou o fechamento final. O GU apresentou maior efeito de quimiotaxia dos macrófagos no dia 3. Nos dias 8 e 10 os grupos laser mostraram mais macrófagos que o controle. A partir do dia 15 os grupos se igualaram.

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

Abstract: *The tissue repair of diabetics is usually deficient and can lead to difficulty in healing. Low-level laser therapy is a promising tool aiding the closing of these wounds. The aim of this study is to observe if the change in the delivery of laser interferes with the speed of repair and chemotaxis of macrophages, key cells in the regulation of this process. For such, wounds were made with a punch of 8 mm on the dorsum of diabetic rats chemically converted by intraperitoneal injection and streptozotocin chemically and subsequently subjected to two schemes of delivery of laser light $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, $P = 30$ mW with single dose and fractionated dose. Experimental groups: (1) control*

group (GC)- submitted to ulcer treatment; (2) single dose (GU)- received laser therapy with 4 J/cm^2 , $t = 104$ s; (3) fractionated dose (GF)- received laser on days 1, 3, 8 and 10 being 1 J/cm^2 , $t = 26$ s, totaling a 4 J/cm^2 treatment. After euthanasia, the samples were routinely processed for immunohistochemistry to detect macrophages. Both regimens of energy delivery accelerated wound closure in the early days, but not in the final days. The GU had the highest effect chemotaxis of macrophages on day 3. In the days 8 and 10 laser groups showed more macrophages than control. From day 15 on the groups were similar.

Keywords: *Diabetes, photonics, wound healing, inflammation, tissue repair.*

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia associada a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos. Pode se instalar por defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, como destruição das células beta pancreáticas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros. [1] A Organização Mundial de Saúde prevê que em 2030 existam 366 milhões diabéticos em todo o mundo. [2]

O diabetes resulta em dificuldade no fechamento de feridas pós-cirúrgicas, cegueira, insuficiência renal crônica e/ou feridas crônicas que levam à amputação de membros inferiores. As amputações não traumáticas das extremidades inferiores ocorrem em pacientes diabéticos e 85% destas amputações vêm precedidas de uma úlcera na pele. [3]

Além das complicações clássicas da doença, o DM tem sido associado com a redução da resposta de neutrófilos, células T e distúrbios da imunidade humoral. Linfócitos e monócitos de pessoas com DM secretam menos interleucina 1 (IL-1) e IL-6 em resposta à estimulação por lipopolissacarídeos (LPS). A glicação aumentada inibe a produção de IL-10, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF)- α por células

mielóides e linfócitos T, prejudicando a imunidade celular. [4] O laser de baixa potência (LBP) é reconhecido pelos seus efeitos biomoduladores em diversas situações clínicas, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica. [5,6]

Estudos experimentais em animais e observações clínicas evidenciam que o LBP acelera o processo de reparação tecidual por induzir mitose, modificar a densidade capilar, aumentar a síntese de colágeno, aumentar a conversão de fibroblastos em miofibroblastos e acelerar o processo de cicatrização. [7,8]

Nos pacientes diabéticos a laserterapia acelera o fechamento das feridas traumáticas, cirúrgicas e úlceras crônicas, mesmo em presença de níveis elevados de glicemia. A forma como ele promove esse efeito nos diabéticos ainda precisa ser melhor elucidada. [8,9]

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar se existe diferença no fechamento de feridas cutâneas de diabéticos na aplicação da dose única ou fracionada de LBP e se isso poderia estar relacionado com a presença de macrófagos.

Materiais e métodos

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da UNINOVE (AN 03/2013)

Foram utilizadas 54 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), sempre no mesmo ciclo estral, com diabetes induzido por injeção intraperitoneal de Streptozotocina (50mg/kg – Sigma-Aldrich). A úlcera foi realizada com *punch* de 8 mm no dorso do animal após anestesia e tricotomia. Grupos experimentais: (1) grupo controle (GC) - a úlcera dorsal não foi submetida a tratamento; (2) dose única (GU) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia imediatamente após a realização da ferida; (3) dose fracionada (GF) - a úlcera dorsal recebeu laserterapia nos dias 1, 3, 8 e 10. Os parâmetros da aplicação do laser (Laser diodo, Twin Laser, MMOptics, São Carlos, SP) no grupo GU foram: $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, P= 30 mW, área do feixe: 0,785 cm², D= 4 J/cm², t = 104 s; e no grupo GF foram quatro aplicações de $\lambda = (660 \pm 2)$ nm, P= 30 mW, D= 1 J/cm², área: 0,785 cm², t = 26 s totalizando um tratamento de 4 J/cm².

Nos dias 1 (2 horas após laserterapia), 3, 8, 10, 15 e 22 os animais foram anestesiados, imobilizados e as feridas cutâneas foram fotografadas com câmara profissional Nikon F301 semi-automática acoplada em um tripé a 30 cm do animal. As imagens foram digitalizadas e posteriormente visualizadas em tela de computador. As margens da ferida no dia 1 e no dia da eutanásia foram traçadas manualmente com um mouse usando o *software* ImageJ 1.45 (acesso livre, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Para detecção dos macrófagos foi realizada técnica de imunohistoquímica de acordo com a rotina do laboratório. O anticorpo utilizado foi o anti-CD68 (ABCAM, UK, catálogo: AB31630). As imagens foram digitalizadas e as células marcadas foram contadas

manualmente com auxílio do *plugin cell counter* do *software* ImageJ 1.45 (NIH, Maryland, USA).

Resultados

Avaliação macroscópica das feridas

As análises demonstraram que a aplicação do laser dentro dos parâmetros empregados alterou a morfologia das úlceras diabéticas em ratos. No entanto, as diferenças aparentemente desapareceram no final de 22 dias (Figura 1 e Gráfico 1).

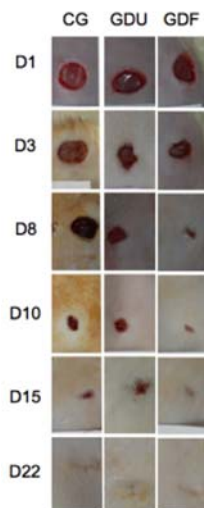


Figura 1: Observação macroscópica do fechamento das feridas nos dias experimentais.

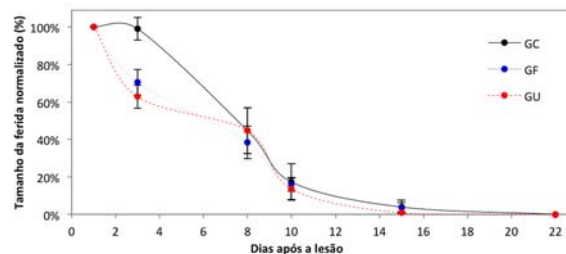


Gráfico 1: Análise da porcentagem de fechamento das feridas durante os dias experimentais. Observa-se que os dois grupos laser tiveram um fechamento semelhante de até 40% nos três primeiros dias experimentais, e ambos foram diferentes do controle ($p < 0,05$). A partir do dia 8 todos os grupos se igualaram.

Deteção e contagem dos macrófagos

Os macrófagos foram detectados pela técnica de imunohistoquímica e apresentam-se em castanho nas figuras seguintes:

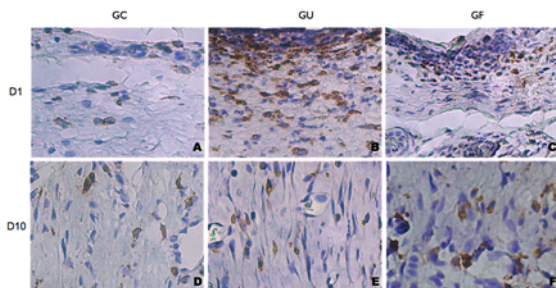


Figura 2: Marcação para macrófagos CD68+ mostrando no dia 1 a maior presença de macrófagos nos animais do GU duas horas após a realização da ferida e irradiação com laser (4 J/cm^2). No dia 10 os dois grupos laser apresentaram quantidades semelhantes de macrófagos enquanto o grupo controle apresentou menos células marcadas. (Imunohistoquímica, DAB, aumento original 400x)

A quantificação dos macrófagos foi feita de modo manual com auxílio do software ImageJ, usando o aplicativo de contagem celular e os resultados estão representados no Gráfico 2, a seguir:

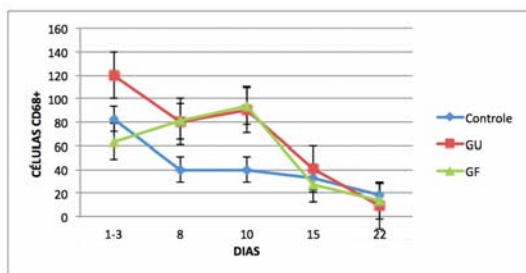


Gráfico 2: Quantificação de macrófagos por tempo e grupo experimental. Nota-se que no dia 1 e 3 o GU teve um aporte maior de células CD68 + ($p < 0,05$), enquanto GF e controle são semelhantes. Nos dias 8 e 10 os grupos laser se igualaram, com mais células que o GC, e a partir daí o número de células caiu para quantidades semelhantes entre os grupos.

Discussão

Esses dados trazem um aporte ao conhecimento como diferentes regimes de entrega da luz podem influenciar no comportamento das células inflamatórias na vigência do diabetes. O laser de baixa potência interfere na quimiotaxia dos macrófagos em animais diabéticos. Durante a fase inflamatória do reparo, nos dias 1 e 3, a maior dose (4 J/cm^2) favorece a atração de macrófagos em 40% a mais que no grupo controle e no dose fracionada (1 J/cm^2). Após o terceiro dia o número de macrófagos começa a diminuir nos grupos controle e dose única, mas aumenta no grupo fracionado enquanto há aplicação de laser (até o dia 10). A partir desse ponto, que coincide com a fase de remodelamento (dias 15 e 22) a presença de macrófagos nos grupos se iguala e provavelmente esse declínio de macrófagos se deve ao término da fase inflamatória do reparo.

Com relação ao fechamento das feridas, a partir do dia 8 e até o final do experimento, não existe diferença entre os grupos, todavia, nos três primeiros dias os animais que receberam laser mostraram uma diminuição da área lesionada em 40%, diferentemente do controle, cuja área manteve-se igual ao do dia 1. Quanto menor a área de exposição do tecido conjuntivo e associado à maior quimiotaxia de macrófagos, menor o risco de infecções, o que é benéfico aos pacientes.

Conclusão

O laser de baixa potência favorece o fechamento inicial das feridas dos diabéticos e aumenta a quimiotaxia de macrófagos para o local lesionado.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio regular 2012/01944-0.

Referências

- [1] Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, n. 16 Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2006.
- [2] Organização Mundial de Saúde [internet]. 2012. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes>.
- [3] Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. International Working Group on Wound Healing and Treatments for People with Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20:578–89.
- [4] Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Prac.* 1993; 19:183–8.
- [5] Hamblin MR, Huang Y-Y, Chen ACH, Carroll JD. Biphasic dose response in low level light therapy. *International Dose-Response Society.* 2009; 7:358-383.
- [6] Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of óiomized placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet.* 2009; 374:1897–908.
- [7] Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-Neon Laser Treatment Transforms Fibroblasts into Myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1990; 137(1):171-8.
- [8] Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible HeNe and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003; 33:344-351.
- [9] Fulop AM, Dhimmer S, Deluca JR, Johanson DD, Lenz RV, Patel KB, Douris PC, Enwemeka CS. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(5):695-702.