

QUANTIFICAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS E COLÁGENO NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS FRENTE A DIFERENTES REGIMES DE ENTREGA DO LASER

A. P. Souza*, D. F. T. Silva**, J. A. F. Shibuya*, S. K. Bussadori**, R. A. Mesquita-Ferrari** e C. M. França**

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

** Docente do Programa de Pós- Graduação em Biofotônica, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brasil
e-mail: cristiane321@gmail.com

Resumo: O objetivo deste estudo foi investigar se métodos diferentes de entrega do laser interferem na quantidade de miofibroblastos e de colágeno durante o reparo de úlceras em condição de hiperglicemia. Para tal, foram realizadas úlceras de 8 mm de diâmetro no dorso de 60 ratas Wistar com diabetes induzido por streptozotocina. Os animais foram divididos em três grupos: G1 (controle) – sem tratamento úlceras; G2 – úlceras submetidas a uma dose única de laserterapia ($\lambda = 660 \pm 2$ [nm], $D = 4$ J/cm², $t = 104$ s) duas horas após a lesão; e G3 – úlceras submetidas a doses fracionadas de laserterapia ($\lambda = 660 \pm 2$ [nm], $D = 1$ J/cm², $t = 26$ s) nos dias 1, 3, 8 e 10. Três animais de cada grupo sofreram eutanásia nos dias 8, 10, 15 e 22. As úlceras foram removidas, processadas e coradas por hematoxilina/eosina e picosirius para a análise da morfologia e colágeno tipo I, respectivamente. Para a detecção de miofibroblastos foi feita imunohistoquímica. Os resultados demonstram que independentemente do regime de entrega de luz há mais miofibroblastos nos grupos que receberam laser que no controle. A quantidade de colágeno é semelhante em todos os grupos.

Palavras-chave: colágeno, laser, diabetes mellitus, reparo tecidual.

Abstract: The aim of this study was to investigate whether different methods of laser delivery influence the quantity of myofibroblasts and collagen during the repair of ulcers in condition of hyperglycemia. Ulcers measuring 8 mm in diameter were made on the back of 60 Wistar female rats with Streptozotocin-induced diabetes. The animals were divided into three groups: G1 (control) – untreated ulcers; G2 – ulcers treated with a single dose of laser ($\lambda = 660 \pm 2$ [nm], $D = 4$ J/cm², $t = 104$ s) two hours after the injury; and G3 – ulcers treated with four fractionated doses of laser ($\lambda = 660 \pm 2$ [nm], $D = 1$ J/cm², $t = 26$ s) on days 1, 3, 8 and 10. Five animals in each group were euthanized on days 8, 10, 15 and 22. The ulcers were removed, routinely processed and stained with hematoxylin/eosin and picosirius red for morphological analysis and collagen types detection. Immunohistochemistry analysis was also performed for the detection of myofibroblasts. The

results showed that regardless the laser delivery regimen there are more myofibroblasts in the groups that received laser than the control group. The amount of collagen is similar in all groups.

Keywords: collagen, laser, diabetes, wound repair.

Introdução

A terapia com laser de baixa potência (LBP) tem sido empregada com maior frequência na prática clínica como um complemento para o controle da dor e a aceleração do processo de reparação de tecidos, úlceras crônicas, queimaduras e feridas cirúrgicas. Seus efeitos biomodulatórios incluem aumento da mitose e angiogênese, alterações na síntese de citocinas, aumento da síntese de colágeno e ajuda na conversão dos fibroblastos em miofibroblastos. Estes efeitos foram demonstrados em estudos pré-clínicos e clínicos. No entanto, a falta de padronização sobre dosimetria e regimes de entrega de luz e a compreensão incompleta dos associados mecanismos celulares e moleculares limitam o uso deste recurso [1,2].

O processo de cicatrização é caracterizado por um conjunto coordenado, progressivo de eventos dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. O objetivo é restaurar a função de barreira e a integridade mecânica da pele através do recrutamento de mediadores, células inflamatórias, matriz extracelular e células-tronco [3,4]. Em pacientes diabéticos, no entanto, os mecanismos de reparo do tecido estão comprometidos devido a reduções na função de resposta e neutrófilos de célula T, bem como as alterações na imunidade humoral, síntese de colágeno, angiogênese e contração das feridas [5]. Assim, os indivíduos com diabetes são mais suscetíveis ao desenvolvimento de deiscência pós cirúrgica, infecções e úlceras crônicas [6,7].

Um dos eventos fundamentais para o bom reparo tecidual é a conversão dos fibroblastos em miofibroblastos, que expressam proteínas contráteis em seu citoplasma, e viabilizam a contração adequada da ferida e remodelamento do colágeno. Considerando a laserterapia um complemento em potencial para a cicatrização de feridas pós cirúrgicas na vigência do

diabetes, o objetivo desse estudo é investigar se aplicar uma dose única de laser logo após a cirurgia equivale a aplicar 4 sessões da laserterapia no pós-operatório. Para tal foram avaliados a morfologia do reparo, quantidade de miofibroblastos e colágeno I.

Materiais e métodos

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

Sessenta ratas da linhagem Wistar adultas (massa corpórea de 140 a 250 g), após jejum de 12 h com livre acesso à água, foram induzidas à hiperglicemia com uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) dissolvidos em tampão de citrato 0,05 M (dose: 50 mg/kg). Os níveis glicêmicos sanguíneos foram monitorados e foram selecionados para o experimento animais com glicemia maior que 220 mg/dL.

Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de ketamina HCl (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (Anasedan, Vetbrands, SP, Brasil). Os pelos foram removidos da região dorsal com um barbeador elétrico seguido da aplicação de creme à base de tioglicolato (creme Veet, SP, Brasil). A pele foi limpa com uma solução de clorexidina 0,12%. Um punch cirúrgico de 8 mm (Richter, SP, Brasil) foi usado para produzir feridas redondas na porção central do dorso. Os animais foram mantidos numa base aquecida (37°C) para evitar a hipotermia até a completa recuperação da anestesia.

Grupos experimentais

Após a certificação de que todos os animais se converteram em diabéticos, eles foram divididos em três grupos: GC (grupo controle diabético; n = 20) – sem tratamento das úlceras; GU (n = 20) – úlceras submetidas a uma dose única de laserterapia e GF (n = 20) – úlceras submetidas a doses fracionadas de laserterapia nos dias 1, 3, 8 e 10. Estes dias de tratamento e eutanásia foram escolhidos como representantes de momentos principais no processo de reparação: a inflamação (dias 1 e 3), a proliferação (dias 8 e 10) e a remodelação (dias 15 e 22).

Irradiação do laser

Utilizou-se um laser de arseneto de gálio-alumínio (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), com potência de saída de 30 mW e comprimento de onda $\lambda = 660 \pm 2$ [nm]. Os parâmetros usados no GU foram densidade de energia $D = 4$ J/cm² e tempo de exposição $t = 104$ s. No grupo GF foram quatro doses de $D = 1$ J/cm² e $t = 26$ s. A saída do equipamento foi aferida usando um medidor de energia (LaserCheck, Coherent, Santa Clara, CA, EUA). O feixe foi ampliado para 10 mm de diâmetro usando uma lente divergente, para assegurar a cobertura completa da úlcera.

Análise da morfologia do reparo

Cinco animais de cada grupo sofreram eutanásia 8, 10, 15 e 22 com uma overdose de anestésico. As úlceras foram removidas, fixadas em formalina 10% tamponada (pH 7,4) e incluídas em parafina. Um corte de 5 μ m de cada amostra foi corado com hematoxilina e eosina, e picrossirius para análise microscópica.

Análise imunohistoquímica dos miofibroblastos

Dos mesmos tecidos parafinados (3 μ m) foram colocados em lâminas de vidro revestidas com 2% 3-aminopropyltriethylsilane (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e desparafinizadas em xilol, seguido de imersão em álcool e incubação com 3% de peróxido de hidrogênio diluído em solução salina tampão Tris (TBS) (pH 7,4). As seções foram bloqueadas pela incubação com soro de cabra normal 3% por 20 minutos e imerso em tampão citrato (pH 6,0; Sigma) a 95 ° C por 20 minutos para recuperação do antígeno. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo para detecção de actina de músculo liso isoforma alfa (SMA) (ABCAM, ab5694). As amostras foram preservadas numa câmara umidificada durante a noite a 4° C, seguida de lavagem das seções com TBS, incubação com N-Histofine simples (Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão) por 30 minutos e incubação em 3, 3'-diaminobenzidina em uma solução de cromogênica (Dako) à temperatura ambiente por dois a cinco minutos. Os cortes foram, em seguida, corados com hematoxilina de Mayer e cobertas com Permount e lamínula. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos com 1% PBS/albumina bovina (501 X-1, Dako).

Contagem de células

A partir da área de maior concentração de miofibroblastos, denominada *hot spot*, cinco campos consecutivos da ferida foram fotografados (aumento: 400x - Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Um patologista experiente com nenhum conhecimento prévio das amostras analisou as imagens com o auxílio do programa ImageJ 1.45 (software livre, NIH, Bethesda, Maryland, EUA), usando o plug-in *cell counter*. Para minimizar o erro intra-observador, as análises foram feitas em triplicata, em dias diferentes e o resultado apresentado é a média dessas contagens.

Quantificação de colágeno I

A análise de colágeno I na fase de remodelação foi realizada em cortes histológicos de amostras coradas com picrossirius e examinados sob um microscópio de luz polarizada (Pol-Interferencial fotomicroscópio - modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). Usando este sistema, fibras de colágeno I emitem luz verde e fibras densamente compactas de colágeno I emitem desde luz laranja até vermelha. As fotografias foram digitalizadas

e tratadas usando o programa de software ImageJ 1.45 para quantificar cada tipo de colágeno e determinar as proporções de fibras e fibrilas.

Análise estatística

O programa Minitab 16 (Minitab Inc, EUA) foi usado para a análise estatística. Os dados de contagem de células provaram ser não-paramétricos. Assim, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para as comparações, com o nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), o teste de Dunn foi aplicado como um *post hoc*.

Resultados

A análise morfológica das úlceras demonstrou que todos os grupos passaram pelas etapas de inflamação, proliferação e remodelamento nos dias esperados e no dia 22 todos os grupos apresentavam morfologia semelhante e quantidades similares de colágeno (Figura 1).

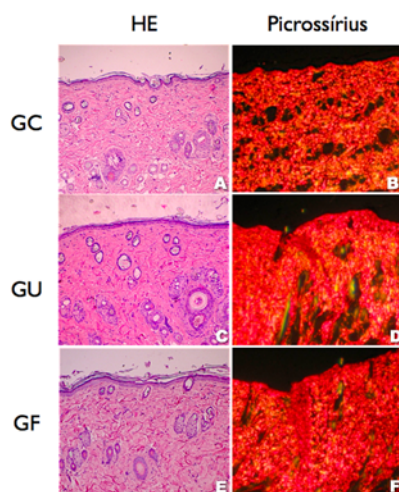


Figura 1: Avaliação morfológica (A, C, E) e de colágeno (B, D, F) mostrando similaridade nos grupos, tanto no reparo tecidual quanto na quantidade de colágeno I. O material visto em verde representa pelos do animal, mostrando regeneração também de anexos cutâneos.

Houve presença de miofibroblastos em todos os grupos experimentais (Figura 2).

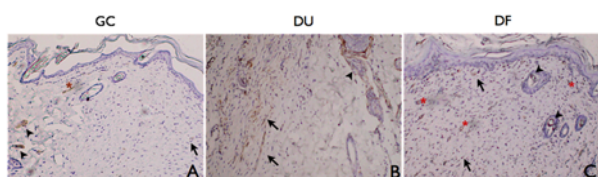


Figura 2: Marcação imunohistoquímica para miofibroblastos no dia 15. As setas indicam os miofibroblastos. As cabeças de seta indicam músculo

liso associado ao folículo piloso. Os asteriscos evidenciam vasos sanguíneos e constituem um controle positivo interno da amostra.

A quantificação dessas células mostrou que elas estavam presentes em todos os grupos e dias experimentais (Gráfico 1), todavia os grupos que receberam laser possuíam mais miofibroblastos.

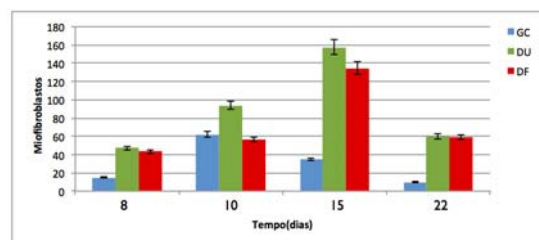


Gráfico 1: Quantificação de miofibroblastos mostrando um aumento do número dessas células nos grupos tratados com laser, especialmente nos dias 10 e 15, quando o grupo dose única apresentou mais células que o dose fracionada e o controle ($p < 0,05$).

Discussão

Este trabalho mostrou que na vigência do diabetes a laserterapia auxilia o surgimento de miofibroblastos em feridas cutâneas, mas que isso não impacta na morfologia do reparo tampouco quantidade final de colágeno do tipo I.

O diabetes é um problema de saúde pública, com a prevalência estimada em 177 milhões pessoas em todo o mundo no ano 2000, com este valor deve chegar a 350 milhões em 2025. Um grande número de amputações não-relacionado com trauma ocorre em pacientes com diabetes e 85% destas amputações são precedidas por úlceras na pele. O modelo de diabetes experimental utilizado no presente estudo simula o diabetes tipo 1, pois a estreptozotocina é tóxica para as células beta do pâncreas, produzindo uma resposta de tecido em condições de hiperglicemia.

O modelo de indução de diabetes do tipo 1 em ratos usando a estreptozotocina é bem estabelecido na literatura, visto que essa droga possui toxicidade seletiva para as células beta das ilhotas pancreáticas e gera um processo inflamatório em ratos de modo semelhante ao que ocorre no humano. Os animais desenvolvem hiperglicemia e a maioria das alterações metabólicas decorrentes do diabetes tipo 1 [8].

Fibroplasia é um mecanismo que envolve a proliferação de fibroblastos e migração para o interior do tecido lesado pelo estímulo de fatores de crescimento, tais como TGF- β , que também induz a diferenciação de miofibroblastos (fundamentais para o processo de reparação). Tais células sintetizam matriz extracelular e contribuem grandemente para a contração da ferida [9,10]. Nesse estudo, os miofibroblastos estão presentes desde o dia 8 e têm um aumento na sua

quantidade até o dia 15, depois diminuem em todos os grupos. Esse comportamento acompanha a fase de proliferação e remodelamento das feridas. Nota-se que o grupo diabético que não recebeu laser mostrou menos miofibroblastos, o que prejudica o fechamento da ferida e sua qualidade final.

Como não foram observadas diferenças nas quantidades de colágeno entre os grupos, a próxima hipótese seria que o laser pode auxiliar na organização desse colágeno e na qualidade final da ferida. Para responder a esses questionamentos, são necessárias análises da organização do colágeno e testes funcionais de contração da ferida.

Conclusão

A laserterapia, independentemente do regime de entrega da luz, mostrou-se eficaz em aumentar a quantidade de miofibroblastos em feridas cutâneas de ratos diabéticos, mas não interferiu na morfologia final do reparo, tampouco na quantidade de colágeno I.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro (auxílio regular (2012/01944-0) e pela bolsa de iniciação científica (2012/03334-4).

Referências

- [1] Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TME. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 3–13.
- [2] Piccirillo LJ, Gonçalves MFR, Clemente ELS, Gomes MB. Marcadores de Inflamação em Pacientes Com Diabetes Mellitus Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48/2:253-260
- [3] Cressoni MDC. Influência do Laser AsGaAl sobre a cartilagem epifisária de ratos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2009.
- [4] David LS, Christopher A, Theodore C, Mary C, Michael Franz, Lawrence Harkless, Andrew Johnson, Hans Moosa, Martin Robson, Thomas Serena, Peter Sheehan, Aristidis Veves and Laurel Wiersma-Bryant. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2006;14(6):680-692.
- [5] Brunner G, Blakutny R. Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Throm Haemost.* 2004;92:253-261
- [6] Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther.* 1991;52:407-22.
- [7] Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52/6:940-950.
- [8] Mascaro MB, França CM, Esquerdo KF, Lara MA, Wadt NS, Bach EE. Effects of Dietary Supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014:107629.
- [9] 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
- [9] Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. 2010 December; 2(12 Suppl 2): S292–S305.