



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Eduardo Tavares Lima Trajano

**Influência do laser vermelho de baixa potência no processo de reparo de
queimaduras de segundo grau**

Rio de Janeiro

2015

Eduardo Tavares Lima Trajano

**Influência do laser vermelho de baixa potência no processo de reparo de queimaduras
de segundo grau**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Humana e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Monte-Alto-Costa

Coorientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T768 Trajano, Eduardo Tavares Lima.
Influência do laser vermelho de baixa potência no processo de reparo de
queimaduras de segundo grau / Eduardo Tavares Lima Trajano. – 2015.
66 f.

Orientadora: Andréa Monte-Alto-Costa
Coorientador: Adenilson de Souza da Fonseca
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e
Experimental.

1. Cicatrização de feridas - Teses. 2. Terapia a Laser de Baixa Potência. 3.
Reparo de DNA - Teses. 4. Queimaduras – Teses. I. Costa, Andréa Monte
Alto. II. Fonseca, Adenilson de Souza da. III. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV.
Título.

CDU 616-003.9

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Eduardo Tavares Lima Trajano

Influência do laser vermelho de baixa potência no processo de reparo de queimaduras de segundo grau

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de janeiro de 2015

Coorientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof^ª. Dra. Andréa Monte-Alto-Costa (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizoto
Universidade Federal de São Carlos

Prof^ª. Dra. Flávia de Paoli
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^ª. Dra Bruna Romana de Souza – UERJ
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que foram meu porto seguro durante toda a minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Tavares e Elizonete, pelos valores morais passados a mim, que com toda certeza são mais importantes que qualquer artigo que publiquei ou que irei publicar um dia. Meu pai não teve tempo de me ver concluindo essa etapa da minha vida, mas tenho certeza de que onde ele estiver está muito feliz, pois ele sabe que essa vitória não é só minha, mas dele também por todo o esforço que fez durante muitos anos que me possibilitaram estar aqui hoje.

Agradeço a minha esposa, Larissa, pela compreensão nesses últimos 4 anos. Sei que esses anos foram difíceis não só para mim, mas também para ela. Muita das vezes estive ausente, ora no trabalho ora no laboratório e tenho certeza que sem sua compreensão isso não seria possível. Pelo apoio, pois nos momentos difíceis em que pensava se tudo isso valia a pena sempre tive seu apoio.

Agradeço a meus amigos, em especial ao Marco Aurélio e Jackson. Pessoas que consideram como irmãos, que sempre estão próximos não só nos bons momentos, mas também nos momentos difíceis. Tenho poucos amigos, mas esses valem por muitos.

Agradeço ao professor Frank Bezerra, que durante a graduação foi a minha primeira referência como professor e que me mostrou um caminho a ser seguido e que sigo até hoje.

Agradeço a professora Andréa Monte-Alto-Costa, por me receber no seu laboratório e ter assumindo a minha orientação durante um momento complicado da minha vida. Sempre se mostrou disponível a ajudar, inclusive na bancada, essa é uma característica difícil de encontrar e que particularmente eu admiro. O período em que eu passei sob sua orientação foi e será muito importante para mim.

Agradeço ao professor Adenilson Fonseca, que tive a felicidade de conhecer durante o doutorado e que apesar de pouco tempo de colaboração acrescentou muito para mim. É um professor que lida com as pessoas da mesma forma, independente se é um aluno de iniciação científica, doutorando ou professor, isso é admirável.

Agradeço ao professor Cristóvão Porto, pela oportunidade durante o mestrado e o doutorado e pelo apoio no meu retorno no doutorado.

Agradeço ao professor Samuel Valença, pela oportunidade e por ter aberto as portas do seu laboratório na iniciação científica e posteriormente no mestrado.

Agradeço aos alunos e professores do laboratório de reparo tecidual (LRT) que tiveram participação direta ou indireta no meu projeto.

Não importa o quanto você bate, mas sim o quanto aguenta apanhar e continuar. O quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha.

Rocky Balboa

RESUMO

TRAJANO, Eduardo Tavares Lima. **Influência do laser vermelho de baixa potência no processo de reparo de queimaduras de segundo grau**. 2015. 71 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O objetivo do estudo foi investigar os efeitos do laser terapêutico vermelho de baixa potência no processo de reparo tecidual em ratos submetidos à queimadura de segundo grau, investigando ainda se o momento da intervenção pode influenciar influência no processo de cicatrização e a expressão de genes envolvidos no reparo do DNA pelos mecanismos de excisão de bases e de nucleotídeos. Os animais foram divididos da seguinte forma: grupo controle (n = 12) – ratos submetidos à queimadura e não irradiados, grupo laser inicial (n = 12) – ratos queimados e irradiados 1 dia após a queimadura e irradiados por 5 dias consecutivos e grupo laser tardio (n = 14) – ratos queimados e irradiados 4 dias após a queimadura e irradiados por 5 dias consecutivos. A irradiação com laser foi baseada em protocolo clínico (20 J/cm², 100 mW, modo contínuo, 660 nm) sugerido pelo fabricante do equipamento. Parte dos animais foi sacrificado 10 dias após a queimadura e a outra parte foi sacrificada 21 dias após a queimadura. O laser terapêutico acelerou o fechamento da lesão no grupo laser tardio 10 e 21 dias após a queimadura e acelerou a reepitelização 18 dias após a queimadura. Observou-se um aumento do tecido de granulação no grupo laser tardio 10 e 21 dias após a queimadura. Um aumento da expressão do colágeno tipo III e TGF- β foi observado 21 dias após a queimadura em ambos os grupo irradiados. Ambos os grupos irradiados tiveram aumento no número de macrófagos, miofibroblastos 10 dias após a queimadura e diminuição 21 dias após a queimadura. Quanto ao reparo do DNA, 10 dias após a queimadura, foi observado que o laser terapêutico aumenta a expressão de OGG1 e XPA reduz a expressão de APE1 e XPC em ambos os grupos irradiados. A exposição ao laser terapêutico vermelho de baixa potência contribuiu para o processo de reparo tecidual na queimadura de segundo grau, sugerindo que a intervenção durante a fase proliferativa é crucial no resultado final do processo de reparo. Além disso, o laser terapêutico foi capaz de alterar a expressão de genes envolvidos no reparo do DNA.

Palavras-chave: Laser terapêutico de baixa potência. Queimadura. Cicatrização de ferida.
Reparo de DNA.

ABSTRACT

TRAJANO, Eduardo Tavares Lima. **Influence of low level red laser in repair of second degree burns.** 2015. 71 p. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The aim of this study was to investigate the effects of low-level red laser on tissue repair in rats submitted to second degree burn, evaluating if the timing of laser treatment influence on the healing process and investigate the expression of the genes involved with DNA repair by base excision and nucleotide excision pathways. The animals had their backs shaved and divided as follows: control group (n = 12) - rats burned and not irradiated, early laser group (n = 12) - rats burned and irradiated from day 1 after injury for 5 consecutive days, and late laser group (n = 14) - rats burned and irradiated from day 4 after injury for 5 consecutive days. Laser irradiation was according to a clinical protocol (20 J/cm², 100 mW, continuous wave emission mode, 660 nm) as recommended by the laser device manufacturer. Half of the animals were sacrificed 10 days after burn and the other animals were sacrificed 21 days after burn. Late laser group accelerated wound contraction 10 and 21 days after burn. Late laser group accelerated reepithelialization 18 days after burn. Late laser group increased the granulation tissue 10 and 21 days after burn. Both irradiated groups increased type III collagen expression and TGF- β 21 days after burn. Both irradiated groups increased macrophages and myofibroblasts number 10 days after burn, and decreased 21 after days. Low-level red laser exposure reduced the expression of APE1 messenger (mRNA), increased the expression of OGG1, reduced the expression of XPC and increased the expression of XPA in both irradiated groups laser and later laser groups. Low-level red laser exposure contributes to the process of tissue repair of second degree burns, suggesting that the intervention during proliferative phase is crucial in the final outcome of the repair process. Moreover, the therapeutic laser was capable of altering the expression of genes involved in DNA repair.

Keywords: Low-level red laser. Burn. Wound healing. DNA repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas e camadas da pele.....	16
Figura 2 -	Fase inflamatória do processo de reparo cutâneo.....	17
Figura 3 -	Fase proliferativa do processo de reparo tecidual.....	18
Figura 4 -	Fase de remodelamento do processo de reparo cutâneo.....	19
Figura 5 -	Mecanismos de reparo do DNA.....	20
Figura 6 -	Reparo por excisão de bases.....	21
Figura 7 -	Reparo por excisão de nucleotídeos.....	23
Figura 8 -	Luz monocromática e policromática.....	24
Figura 9 -	Luz coerente.....	25
Figura 10 -	Colimação.....	25
Figura 11 -	Emissão espontânea.....	26
Figura 12 -	Emissão estimulada.....	27
Figura 13 -	Caixa de ressonância.....	28
Figura 14 -	Citocromo c oxidase.....	29
Figura 15 -	Desenho experimental.....	33
Figura 16 -	Análises realizadas no estudo.....	33
Figura 17 -	Macroscopia da área queimada.....	39
Figura 18 -	Porcentagem da área inicial da lesão em 3, 10, 18 e 21 dias após a queimadura.....	40
Figura 19 -	Porcentagem da área reepitelizada em 18 e 21 dias após a queimadura.....	41
Figura 20 -	Espessura da epiderme em 10 e 21 dias após a queimadura...	42
Figura 21 -	Área do tecido de granulação em 10 e 21 dias após a queimadura.....	43
Figura 22 -	Deposição de fibras colágenas em 10 e 21 dias após a queimadura.....	44
Figura 23 -	Expressão proteica do colágeno tipo I.....	44
Figura 24 -	Expressão proteica do colágeno tipo III.....	45
Figura 25 -	Expressão proteica de TGF- β	46
Figura 26 -	Macrófagos CD68-positivos em 10 e 21 dias após a queimadura.....	47

Figura 27 -	Células PCNA-positivas em 10 e 21 dias após a queimadura	48
Figura 28 -	Miofibroblastos em 10 e 21 dias após a queimadura.....	49
Figura 29 -	Vasos positivos para α -actina de músculo liso.....	50
Figura 30 -	Expressão de OGG1 em 10 dias após a queimadura.....	51
Figura 31 -	Expressão de APE1 em 10 dias após a queimadura.....	52
Figura 32 -	Expressão de XPC em 10 dias após a queimadura.....	53
Figura 33 -	Expressão de XPA em 10 dias após a queimadura.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° – Grau

μL – Microlítro

μm – Micrômetro

AlGaInP – Alumínio, gálio, índio e fosfato

AP - apurínica/apirimidínica

APE1 – Endonuclease apurínica/apirimidínica 1

ATP – Adenosina trifosfato

BCA – ácido bicinlônico

BER – Reparo por excisão de bases

C – Celsius

CD68 – Cluster de diferenciação 68

cm² – Centímetro quadrado

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EGF – Fator de crescimento epidérmico

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

GAPDH – Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GGR – Reparo genômico global

J – Joules

kg – Kilograma

mg – Miligrama

mm – Milímetros

mW – Miliwatts

NER – Reparo por excisão de nucleotídeos

nm – Nanômetros

OGG1 – 8-oxoguanina glicosilase

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RFC – Fator de replicação C

RPA – Proteína de replicação A

RPA – Proteína de replicação A

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio
TCR – Reparo acoplado a transcrição
TFIIH – Fator de transcrição de transcrição da RNA polimerase II
TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UV – Ultravioleta
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
XPA – Xeroderma pigmentosa A
XPB – Xeroderma pigmentosa B
XPC – Xeroderma pigmentosa C
XPD – Xeroderma pigmentosa D
XPF – Xeroderma pigmentosa F
XPG – Xeroderma pigmentosa G
 Δ – Delta
 ε – Épsilon
 σ – Sigma

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Epidemiologia da queimadura	15
1.2	Pele e reparo tecidual	15
1.2.1	<u>Fase inflamatória</u>	16
1.2.2	<u>Fase proliferativa</u>	17
1.2.3	<u>Fase de remodelamento</u>	19
1.3	Lesões no DNA	19
1.3.1	<u>Reparo por excisão de bases</u>	20
1.3.2	<u>Reparo por excisão de nucleotídeos</u>	21
1.4	Laser terapêutico	24
1.4.1	<u>Emissão espontânea</u>	26
1.4.2	<u>Emissão estimulada</u>	26
1.4.3	<u>Mecanismo de ação do laser terapêutico</u>	28
1.4.4	Laser terapêutico e reparo tecidual.....	29
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Animais	32
3.2	Laser terapêutico	32
3.3	Desenho experimental	32
3.4	Modelo de queimadura	34
3.5	Análises macroscópicas da lesão	34
3.6	Análises microscópicas da lesão	34
3.7	Western Blotting	35
3.8	Imunohistoquímica	35
3.9	Expressão de genes de reparo do DNA	36
3.9.1	<u>Extração do RNA</u>	36
3.9.2	<u>Síntese do DNA complementar</u>	37
3.10	Análise estatística	37

4	RESULTADOS	39
4.1	Análises macroscópicas	39
4.2	Análises microscópicas	41
4.3	Western Blotting	44
4.4	Imunohistoquímica	46
4.5	Expressão de genes de reparo do DNA	51
5	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A - Aprovação do comitê de ética	67
	ANEXO B – Produção científica (artigo1)	68
	ANEXO C – Produção científica (artigo 2)	69

INTRODUÇÃO

Atualmente as estratégias terapêuticas para restauração do tecido queimado são insatisfatórias do ponto de vista estético e funcional, assim novas estratégias terapêuticas que visam reduzir os danos da queimadura são necessárias (1). O laser terapêutico vem sendo utilizado na prática clínica há cerca de 30 anos por dermatologistas, cirurgiões dentistas e fisioterapeutas (2), porém, apesar do longo período os resultados apresentados nos estudos ainda são divergentes (3).

Já está bem elucidado que a radiação ionizante, como os raios-X, induz danos ao DNA, podendo levar a mutações e até mesmo ao surgimento de câncer (4). Recentemente, estudos mostraram que radiações não ionizantes como o laser podem tanto induzir a produção de radicais livres, quanto alterar a expressão dos genes de reparo de DNA. FONSECA e colaboradores (5) mostraram alterações na expressão de genes de reparo por excisão de bases (BER) em pele e músculo de ratos não lesionados expostos ao laser infravermelho de baixa potência.

Alguns equipamentos comerciais laser possuem protocolos de irradiação com doses, potências e comprimentos de onda específicos para diversas indicações clínicas. Porém, estes protocolos clínicos são baseados em poucos estudos científicos ou foram estabelecidos de forma empírica com base na experiência do próprio profissional (6). Por outro lado, em muitos estudos que investigaram os efeitos de lasers terapêuticos, inclusive na cicatrização de feridas por queimaduras, foram utilizados parâmetros de irradiação sem uma fundamentação fotobiológica clara, o que acabou por gerar resultados conflitantes. Além disso, apesar da radiação não ionizante ser um recurso físico dito seguro conforme a literatura atual, estudos recentes mostraram alterações na expressão de genes relacionados ao reparo de lesões no DNA após irradiação com laser. Desta forma, justificam-se estudos que visem à verificação dos benefícios dos protocolos de irradiação sugeridos pelos fabricantes e identificação de possíveis efeitos adversos da radiação laser de baixa potência.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Epidemiologia da queimadura

Aproximadamente 11 milhões de pessoas por ano são vítimas de queimadura em todo mundo (7). Nos Estados Unidos, a cada ano, 450 mil pacientes recebem tratamento médico devido a queimaduras, levando a mais de 40.000 internações e 3.500 mortes por queimaduras (8) com custo, direto e indireto, que chega a aproximadamente a 7 bilhões de dólares por ano (9). No Brasil, estima-se que ocorram 1 milhão de casos de queimadura todo ano, sendo que 70% ocorrem em residências, e destas, 300 mil ocorrem em crianças (10).

1.2 Pele e reparo tecidual

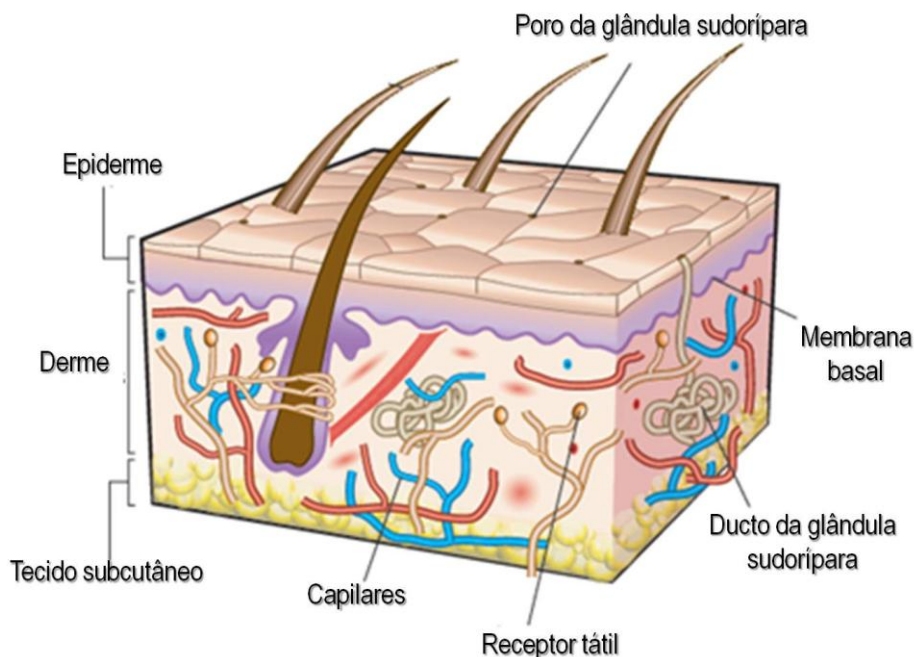
A pele é o maior órgão do corpo humano em extensão, e é responsável por 16% do peso corporal. Tem papel fundamental na homeostasia do organismo ao participar na: (i) regulação térmica; (ii) defesa do organismo, constituindo uma espécie de barreira contra agentes nocivos; (iii) produção de vitamina D; (iv) controle da perda excessiva de água e, (v) sensação somática (11).

A pele e seus anexos constituem o sistema tegumentar. A pele é constituída por duas camadas principais: a *epiderme* e *derme*. A epiderme é constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado constituída de melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e principalmente queratinócitos. Já a *derme* é formada por tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas, servindo de apoio a epiderme e unindo a pele ao tecido subcutâneo, constituindo cerca de 90% da espessura cutânea dependendo da região do corpo observada. A derme é constituída por duas camadas, de limites poucos distintos: a papilar (mais superficial) e a reticular (mais profunda). Abaixo da derme há outra camada de tecido conjuntivo, mais frouxo que a derme, a *hipoderme* ou *tecido subcutâneo* (12). É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia. Dependendo da região e do grau de nutrição, pode ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida,

constitui o panículo adiposo. O panículo adiposo modela o corpo, é uma reserva de energia e proporciona proteção contra o frio (13) (Figura 1).

O processo de reparo tecidual da pele é um processo complexo que envolve a participação de citocinas, diversos tipos celulares, fatores de transcrição e a matriz extracelular em três estágios distintos que se interpõem: *inflamação*, *proliferação* e *remodelamento* (14).

Figura 1 - Figura esquemática da pele



Legenda: Figura esquemática demonstrando as camadas da pele (epiderme e derme) e suas glândulas anexas (ductos e glândulas sudoríparas).

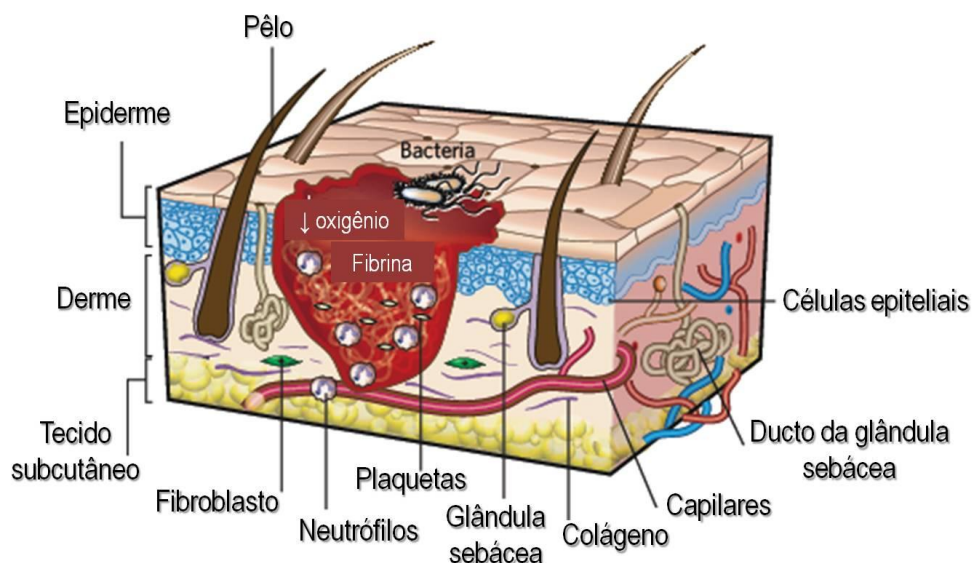
Fonte: Adaptado de MacNeil 2007.

1.2.1 Fase inflamatória

A lesão tecidual provoca o rompimento de vasos sanguíneos e extravasamento dos constituintes do sangue. Assim, a primeira etapa da inflamação é caracterizada por uma resposta vascular e normalização da hemostasia (15). Isso ocorre através da agregação plaquetária no sítio da lesão, e este agregado libera fatores de crescimento como o fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante β (TGF- β) (16). Na segunda etapa da inflamação, o PDGF liberado pelo agregado plaquetário induzirá um influxo células para o sítio da lesão como os fibroblastos (17). No sítio da lesão os

fibroblastos serão estimulados, por sinalização autócrina do TGF- β , a iniciar a deposição de colágeno, nesse momento, principalmente colágeno tipo III (18). Células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos migram para o local da lesão. Os neutrófilos são os primeiros a chegar no local da lesão, tendo como função principal fagocitar agentes nocivos ao organismo. Uma vez fagocitado, estes agentes sofrem a ação de enzimas e espécies reativa de oxigênio e são degradados. Em seguida os macrófagos chegam no local da lesão, tendo como função principal fagocitar microorganismos ou restos celulares, porém, além da capacidade fagocitária ele é responsável pela liberação de fatores quimiotáticos e secreção de fatores de transcrição como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), importantes para a fase seguinte do processo de reparo tecidual (19). Os mastócitos também são atraídos para o local da lesão e liberam histaminas que aumentarão a permeabilidade dos vasos no leito da lesão (20) (Figura 2).

Figura 2 – Figura esquemática da fase inflamatória do processo de reparo cutâneo



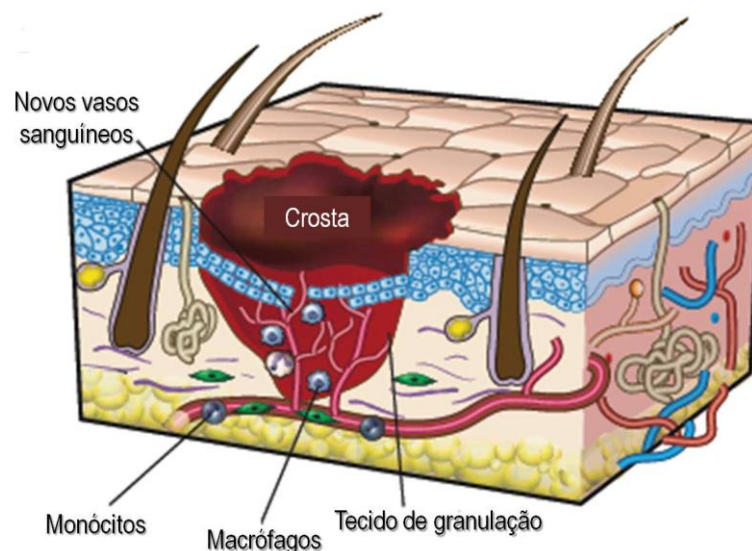
Legenda: Figura esquemática demonstrando principalmente o influxo de células inflamatórias no local da lesão.
Fonte: adaptado de Gurtner 2008.

1.2.2 Fase proliferativa

A segunda fase do processo de reparo tecidual é a fase proliferativa, caracterizada pela reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação (fibroplasia) e deposição de

fibras colágenas (21). A reepitelização é induzida principalmente pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e pelo TNF- α (17). Quando a membrana basal permanece intacta, as células epiteliais progenitoras ficam próximo da lesão e as camadas da epiderme são restauradas geralmente entre 2 e 3 dias. Se a membrana basal for rompida, as células epiteliais migram para o local da lesão e iniciam a proliferação a fim de restabelecer uma barreira de proteção (22). Os miofibroblastos têm papel fundamental no reparo tecidual, uma vez que atuam de forma mecânica aproximando as bordas da lesão devido à sua característica contrátil (23). Essa propriedade contrátil ocorre a partir da expressão de α -actina de músculo liso (24), iniciando-se no 6º dia com um pico no 15º dia e posterior regressão conforme o fechamento da lesão (15). Para dar suporte sanguíneo para etapa de fibroplasia, vasos são formados no leito da lesão através de um processo denominado angiogênese, estimuladas por fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e TNF- α (25). Por fim, os fibroblastos no sítio da lesão sintetizam uma matriz provisória composta por glicosaminoglicanos e fibronectina e, principalmente, colágeno tipo III, um colágeno mais fino que posteriormente será substituído por um colágeno mais espesso (13) (Figura 3).

Figura 3 – Figura esquemática da fase proliferativa do processo de reparo tecidual

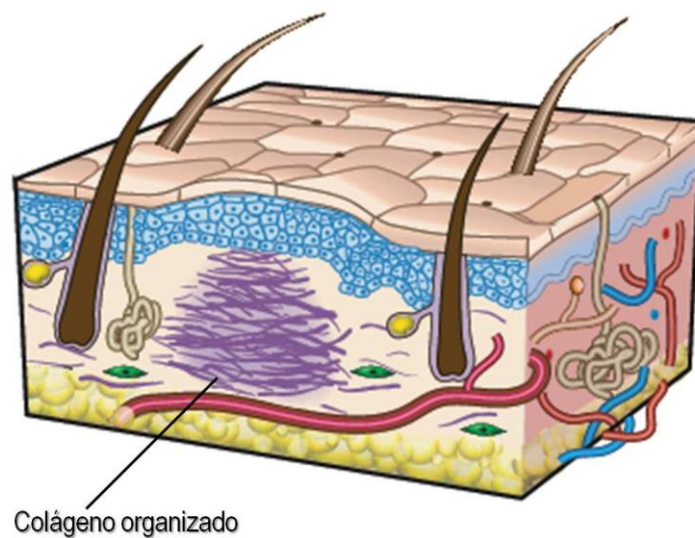


Legenda: Figura esquemática demonstrando a formação de novos vasos e tecido de granulação no local da lesão.
Fonte: Adaptado de Gurtner 2008.

1.2.3 Fase de remodelamento

A terceira fase do processo tecidual é denominada de fase de remodelamento, caracterizada principalmente por redução da celularidade, dos vasos, e pela degradação e reorganização da matriz extracelular (14). Juntamente com a organização da matriz extracelular, ocorre uma substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I (26). Por ser mais espesso e resistente que o colágeno tipo III, a inserção do colágeno tipo I no local da cicatriz irá proporcionar um suporte sólido a lesão facilitando assim a cicatrização da ferida (27).

Figura 4 – Figura esquemática da fase de remodelamento do processo de reparo tecidual



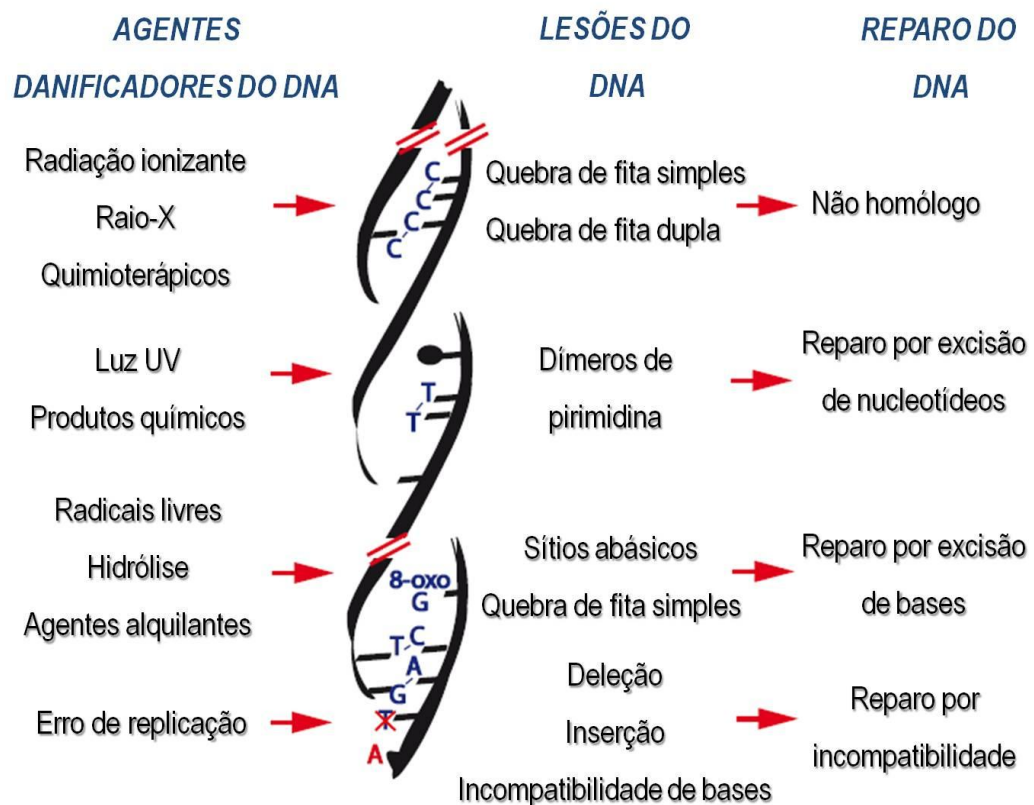
Legenda: Figura esquemática demonstrando a reorganização das fibras colágenas.
Fonte: Adaptado de Gurtner 2008.

1.3 Lesões no DNA

O DNA é continuamente exposto a agentes físicos e químicos do ambiente externo, bem como a produtos dos processos metabólicos endógenos, que podem causar alterações em sua estrutura. O acúmulo de danos na molécula do DNA pode interferir em processos celulares e dar origem a mutações (28). Além disso, o DNA está exposto a agentes nocivos de

forma espontânea através de processos biológicos como a respiração celular, levando a geração de radicais livres (29). Desta forma, devido à constante exposição a diferentes agentes com potencial genotóxico, os mecanismos de reparo de lesões são de fundamental importância para a manutenção da integridade do DNA (Figura 5).

Figura 5 – Figura esquemática dos mecanismos de reparo do DNA



Legenda: Figura esquemática demonstrando diversos agentes danificadores do DNA, induzindo lesões e mecanismos de reparo específico.

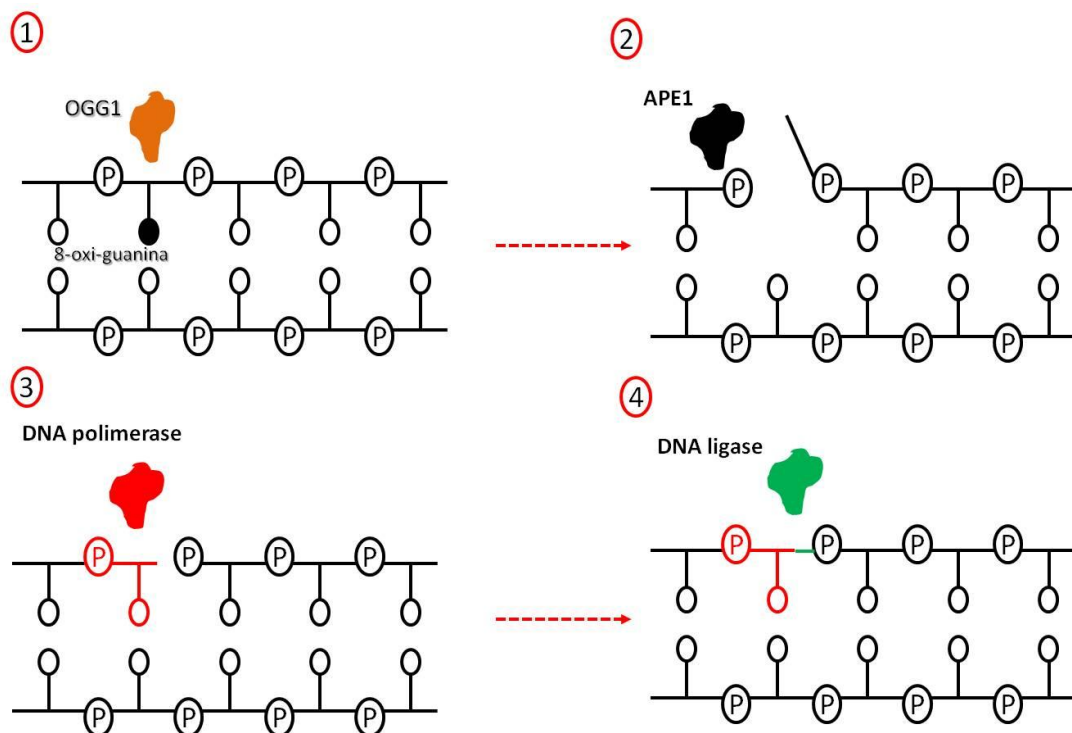
Fonte: Adaptado de Blanpain 2010.

1.3.1 Reparo por excisão de bases

O reparo por excisão de bases (BER) se inicia com a detecção e a remoção de uma base danificada, geralmente por processos oxidativos, através de uma proteína com ação enzimática específica, como por exemplo, a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1), responsável por remover guaninas oxidadas, como a 8-oxoguanina (30). Algumas DNA glicosilases são classificadas como monofuncionais, ou seja, só removem as bases

danificadas. Outras são classificadas como bifuncionais, pois além remover a base danificada, também cliva o sítio da lesão criando um sítio apurínico/apirimidínico (sítio AP) para que na fase seguinte outra base nitrogenada possa ser inserida. Caso a DNA glicosilase seja monofuncional, outra endonuclease fará esse corte no sítio da base removida, como a AP endonuclease 1 (31). Na etapa seguinte ocorre a inserção de uma nova base nitrogenada através da DNA polimerase β e, por fim, a fita do DNA é selada pela ação da DNA ligase (32) (Figura 6).

Figura 6 – Figura esquemática do reparo por excisão de bases



Legenda: Figura esquemática demonstrando as principais fases do reparo por excisão de bases; (1) Detecção e remoção da base oxidada, (2). clivagem da estrutura do DNA no sítio da lesão, (3), inserção de uma nova base, (4) fechamento da estrutura do DNA.

1.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

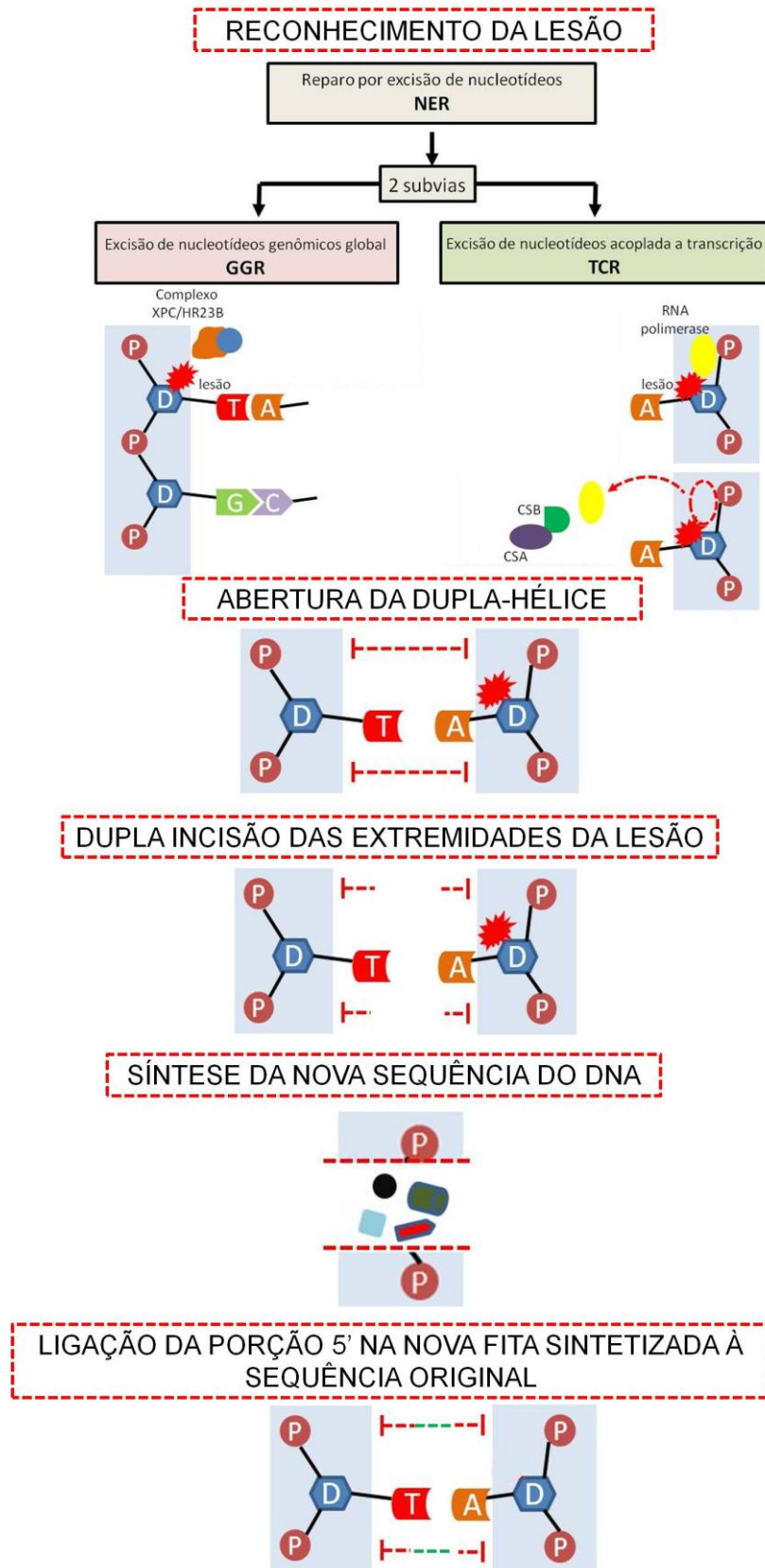
O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é um mecanismo complexo de reparo de DNA que envolve diversas proteínas e atua em vários tipos de lesões. É considerado o principal mecanismo de reparo de lesões no DNA induzidas pela radiação ultravioleta (UV), os chamados dímeros de pirimidina (33). Além destes, o NER atua na remoção de adutos de

DNA gerados por hidrocarbonetos (34). Mais recentemente, foi descrita a participação do NER no reparo de lesões causadas por radicais livres (35). O NER apresenta duas sub-vias: o reparo por excisão de nucleotídeos genômico global (GGR) e o reparo por excisão de nucleotídeos acoplada à transcrição (TCR) (36).

No GGR, a detecção do dano é realizada pelo complexo XPC/HR23B, o qual também recruta a maquinaria do reparo ao local do dano. Já no TCR as lesões causadas por processos oxidativos e por radiação UV podem bloquear a RNA polimerase II, responsável pela transcrição dos genes codificantes de proteínas, o que acaba atuando como um sensor de dano oxidativo uma vez que identificado o dano e a transcrição é interrompida (37). Uma vez detectado o dano, a RNA polimerase II é removida pelas proteínas CSA e CSB, permitindo assim que o reparo prossiga (33).

Uma vez detectada a lesão, o fator de transcrição da RNA polimerase II (TFIIH) é recrutado para o local do dano (38). TFIIH é composto por 9 subunidades dentre elas 2 helicases dependentes de ATP denominadas XPB e XPD, as quais são responsáveis pela abertura da dupla hélice do DNA no local da lesão, permitindo a entrada dos fatores do NER subsequentes (39). Após a abertura da dupla hélice, o complexo de pré-incisão é recrutado, este complexo é composto pelas enzimas RPA, XPA e XPG. Estas proteínas são requeridas para a incisão, bem como para a síntese de reparo. A incisão da fita de DNA é realizada pelas enzimas XPF e XPG, a síntese do reparo, pelas enzimas RPA, RFC, PCNA e polimerases σ/ϵ e o fechamento da fita, pela DNA ligase I (40).

Figura 7 - Reparo por excisão de nucleotídeos



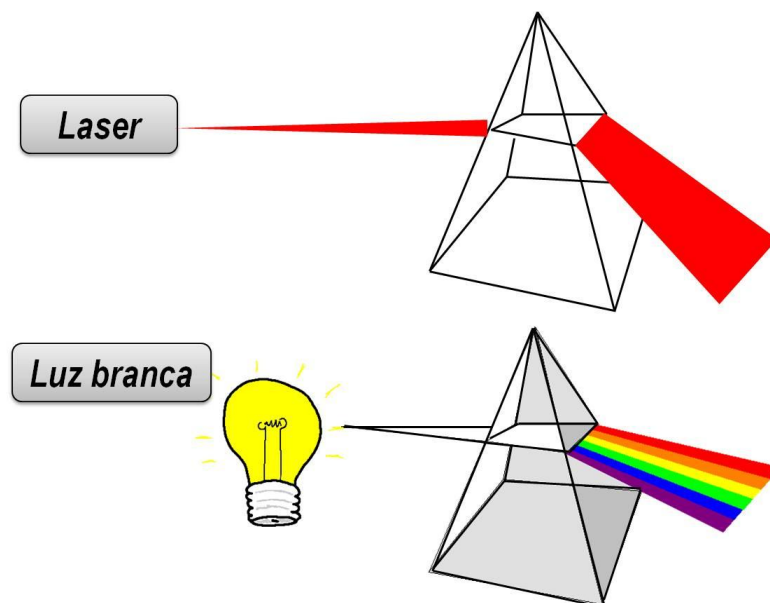
Legenda: Figura esquemática demonstrando os 5 principais eventos no reparo de nucleotídeos.

1.4 Laser terapêutico

O acrônimo *laser* corresponde a uma sigla composta pelas primeiras letras de *light amplification by stimulated emission of radiation*, que significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação” (41). Os lasers podem ser classificados em três categorias: *lasers de alta potência*, também conhecidos como lasers cirúrgicos, que apresentam efeito térmico e potencial de corte; *lasers de média potência*, apresentam efeito térmico, e *lasers de baixa potência*, que são capazes de induzir bioestimulação (ou biomodulação) em células e tecidos biológicos (41).

A radiação laser apresenta três características físicas importantes: monocromaticidade, coerência e colimação. A radiação laser é composta por fótons com o mesmo comprimento de onda, diferentemente da luz convencional que é policromática, ou seja, formada por fótons de diferentes comprimentos de onda. A irradiação com luz monocromática é diferenciada uma vez que possibilita a estimulação seletiva de uma molécula (cromóforo), enquanto a luz policromática estimula diferentes moléculas, podendo haver ação antagônica e, em com isto, ausência de efeito biológico da radiação (42) (Figura 8).

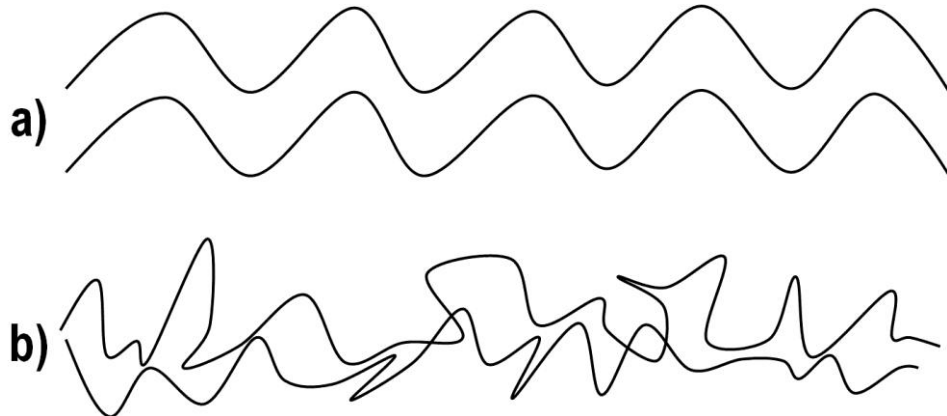
Figura 8 - Características do laser terapêutico quanto ao comprimento de onda



Legenda: Luz monocromática e policromática demonstrando que a dispersão da luz branca ao passar pelo prisma o que não acontece com o feixe laser.

A coerência é uma das características físicas mais importantes da radiação laser. O campo de coerência óptica corresponde à descrição estática dos fenômenos de flutuação nos feixes luminosos e aos efeitos de tais flutuações sobre as correlações entre determinadas grandezas medidas em diferentes pontos do feixe, tanto no espaço como no tempo. Devido a grande coerência da luz laser, este feixe de luz apresenta frequência extremamente uniforme e de grande precisão, diferentemente da luz convencional (Figura 9) (42,43).

Figura 9 - Características do laser terapêutico quanto as coerência



Legenda: (a) Luz coerente, (b) Luz não coerente.

A colimação é a característica do laser que permite que o feixe de fótons fique paralelo ao eixo do tubo que produz este tipo de energia; a luz laser possui divergência angular muito pequena, toda a energia do laser concentra-se precisamente em um ponto focal, diferentemente da luz convencional (Figura 10) (43).

Figura 10 – Características do laser terapêutico quanto a colimação

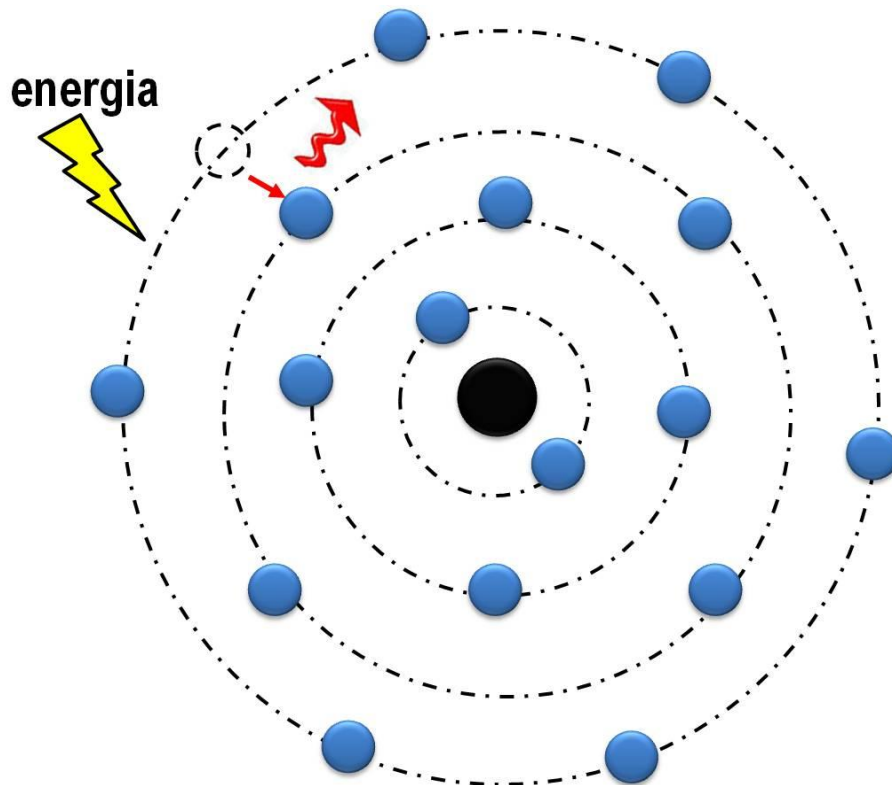


Legenda: Figura esquemática demonstrando o feixe unidirecional do laser e os feixes multidirecionais da luz convencional.

1.4.1 Emissão espontânea

Quando um átomo sai espontaneamente de um estado excitado para um estado menos energético, é chamado de *emissão espontânea*. É comum um átomo em um estado excitado realizar transições para um ou mais estados intermediários, conforme retorna para o estado menos energético. Ao retornar ao seu estado inicial de energia ocorre a liberação de um fóton espontaneamente (43) (Figura 11).

Figura 11 - Emissão espontânea

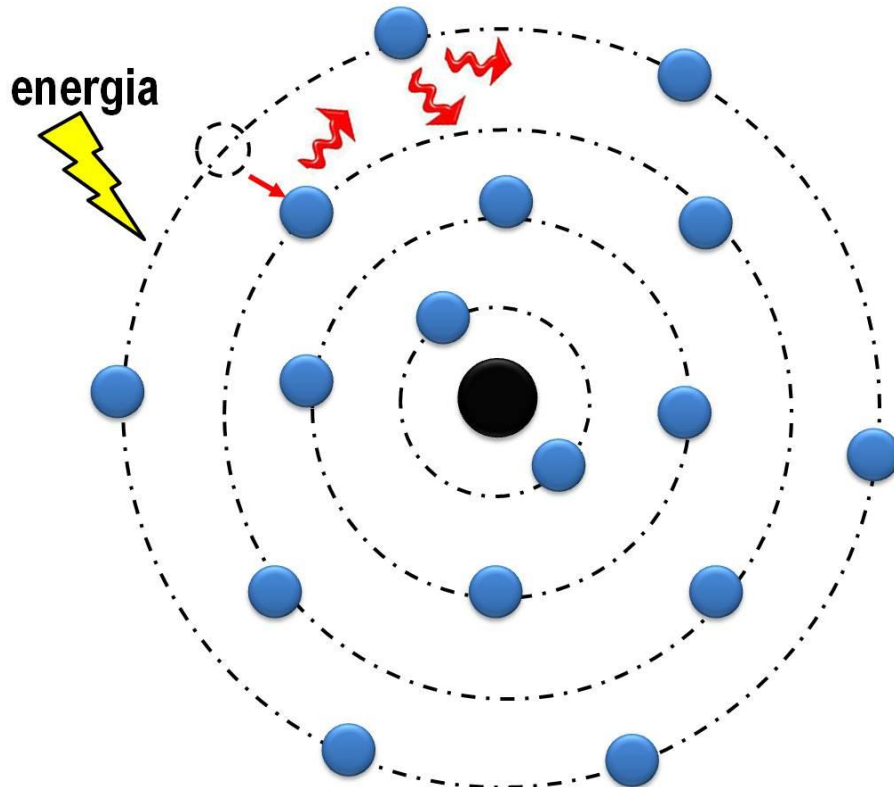


Legenda: Figura demonstrando o fenômeno de emissão estimulada e a liberação de um único fóton.

Diferentemente da emissão espontânea, a *emissão estimulada* é um processo no qual o átomo está inicialmente em um estado excitado de energia e a energia do fóton incidente é exatamente igual à diferença entre o estado excitado e outra energia mais baixa. Neste caso, o campo eletromagnético oscilatório associado ao fóton incidente pode estimular o átomo excitado, que então emite um fóton na mesma direção do fóton incidente e em fase com ele.

Os fótons dos átomos estimulados podem excitar a emissão de outros fótons, amplificando o fóton inicialmente emitido (43) (Figura 12).

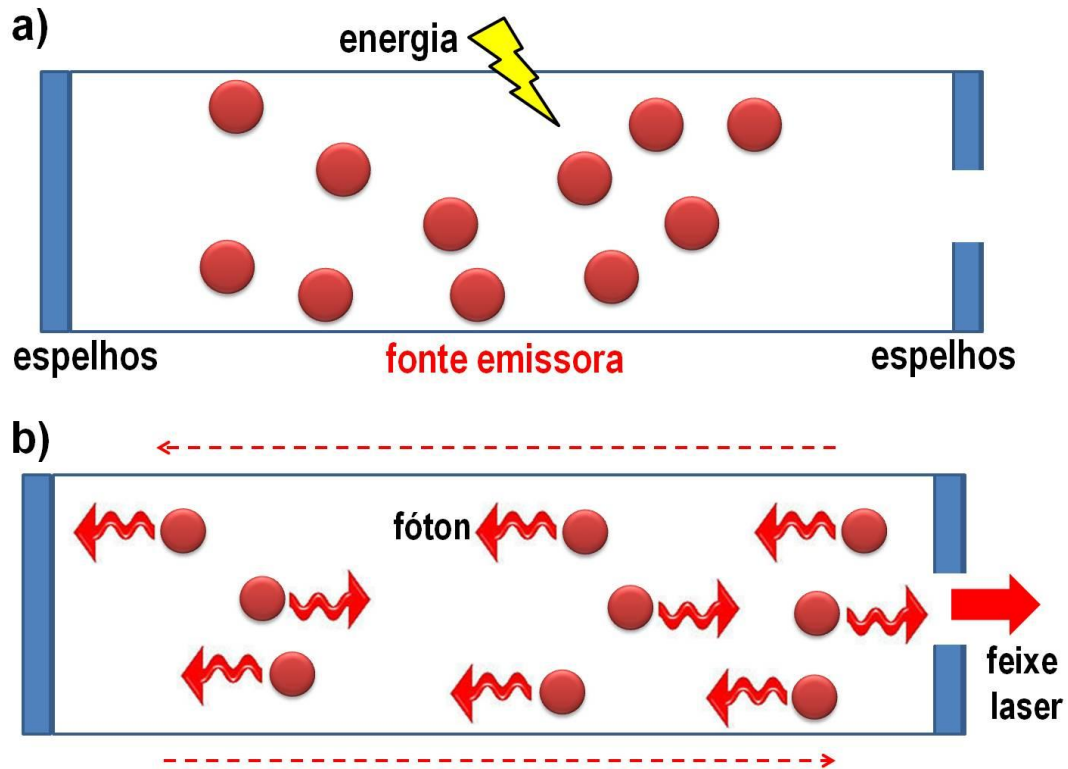
Figura 12 - Emissão estimulada



Legenda: Figura demonstrando a liberação de um fóton inicial e excitando átomos adjacentes e liberando outros fótons.

Este fenômeno ocorre em um dispositivo chamado caixa de ressonância, no qual é formado por duas extremidades uma espelhada e uma semiespilhada, qual um fóton é liberado este reflete em uma das extremidades e em seguida acaba excitando os elétrons mais próximos gerando um efeito em cadeia. Como uma das extremidades é semiespilhada parte do feixe laser é liberada (43,43) (Figura 13).

Figura 13 - Caixa de ressonância

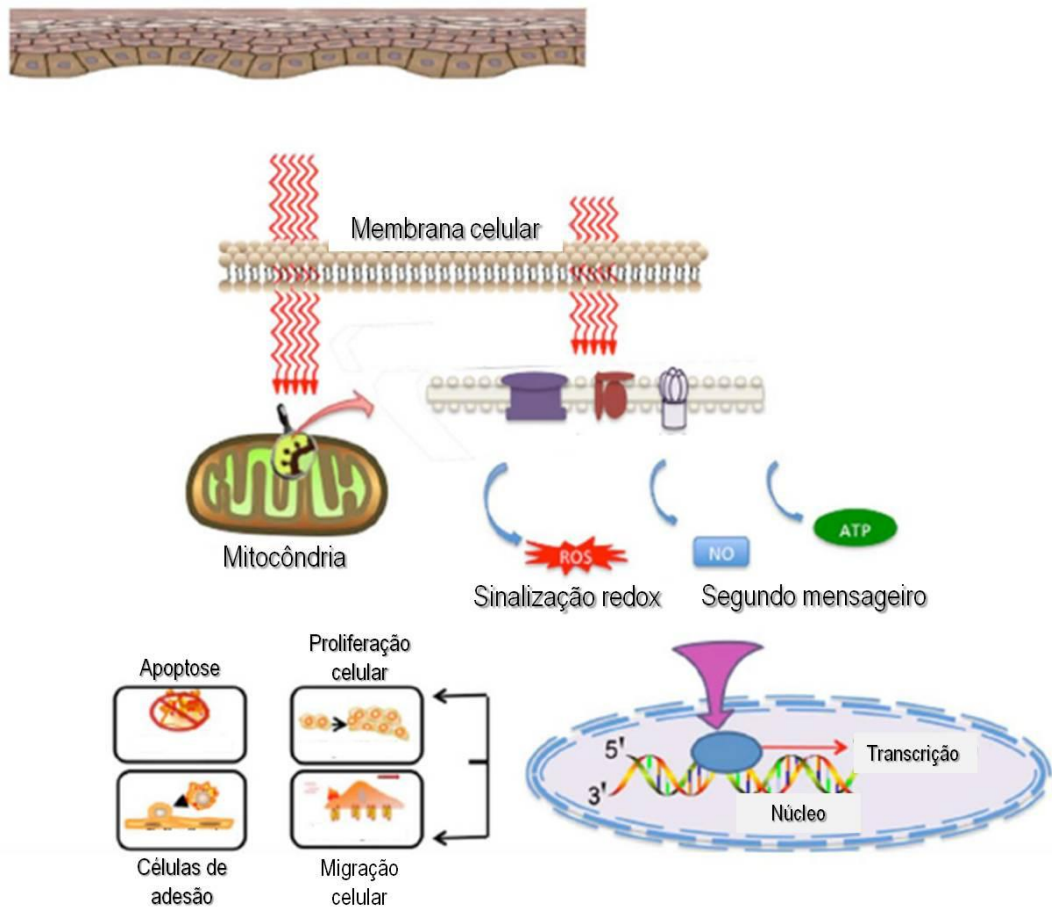


Legenda: (a) Fonte emissora estimulada por eletricidade, (b) geração de fótons na caixa de ressonância e liberação de parte do feixe laser através da extremidade semiespelhada.

1.4.3 Mecanismo de ação do laser terapêutico

Os cromóforos são moléculas que transmite cor ao composto do qual ele faz parte (44). A primeira lei da fotobiologia postula que para o laser terapêutico tenha efeito biológico os fótons devem ser absorvidos pelas pelos cromóforos. Um cromóforo para a luz visível é uma molécula (ou parte de uma molécula) na qual a diferença de energia entre os elétrons em dois orbitais moleculares diferentes coincide com a energia do fóton dentro do espectro visível. Em 1989, foi sugerido que o mecanismo do laser terapêutico em nível celular era baseado na absorção da radiação monocromática visível e no infravermelho próximo por componentes da cadeia respiratória. Dos fotorreceptores conhecidos, o mecanismo de ação que está mais bem elucidada e a citocromo c oxidase, presente na cadeia transportadora de elétrons. Este cromóforo tem a capacidade de absorver luz tanto no espectro vermelho quanto infravermelho levando a um aumento na síntese de ATP, além de estimular a proliferação celular, migração celular dentre outros eventos (43). Além da citocromo c oxidase outros cromóforos que podem ser estimulados pelo laser são a melanina, porfirina, flavinas e hemoglobina (45) (Figura 14).

Figura 14 - Citocromo C oxidase



Legenda: Figura demonstrando a estimulação laser e absorção pelo citocromo c oxidase e a partir daí um cascata de eventos celulares como apoptose, proliferação celular, estimulação de células de adesão e migração celular.

Fonte: Adaptado de Avci 2013.

1.4.4 Laser terapêutico e reparo tecidual

O laser terapêutico foi introduzido inicialmente há mais de 30 anos, primeiramente na dermatologia, no reparo de feridas cutâneas. Posteriormente, foi empregado no tratamento de lesões na mucosa oral, como a herpes e a afta (2). Nos últimos anos a utilização do laser vem se destacando como bioestimulador do reparo tecidual em diversos tecidos, modulando eventos cruciais como migração de queratinócitos, proliferação celular, aumento da vascularização e síntese de colágeno (46).

As fases inflamatória e proliferativa são fundamentais no processo de reparo tecidual e estudos indicam que o laser terapêutico tem o potencial de modular eventos em ambas as

fases. KILÍK e colaboradores (47) realizaram um estudo com ratos Sprague Dawley diabéticos submetidos à lesão cutânea e tratados com laser terapêutico vermelho (635 nm), potência de 1,5 e 15 mW/cm² na dose de 5 J/cm². Neste estudo foi observada redução do infiltrado inflamatório e aumento na deposição de fibras colágenas. Além disso, DANCÁKOVÁ e colaboradores (48) realizaram um estudo com ratos Sprague Dawley diabéticos submetidos à lesão cutânea excisional e tratados com laser terapêutico infravermelho (810 nm) na dose de 0,9 J/cm² e potência de 30 mW e foi demonstrada a aceleração na maturação do tecido de granulação.

Estudos mostram que o laser terapêutico tem o potencial de modular tanto células, quanto fatores de transcrição envolvidos no processo de reparo tecidual. SHARIFIAN e colaboradores (49) realizaram um estudo com ratos *Wistar* diabéticos submetidos à lesão cutânea e tratados com laser terapêutico infravermelho (890 nm) pulsado na dose de 0,2 J/cm², 80 Hz, sendo descrita redução do número de fibroblastos. Além disso, KHOO e colaboradores (50) realizaram um estudo *in vitro* com fibroblastos extraído da pele de ratos diabéticos. Neste, após irradiação com laser infravermelho (810 nm) contínuo na dose de 1J/cm² e potência de 10 mW, foi observado aumento significativo de FGF e PDG e diminuição de VEGF.

Os efeitos do laser terapêutico no reparo tecidual se mostram evidentes não só em nível molecular e histológico, mas também em nível macroscópico. WAGNER e colaboradores (51) realizaram um estudo com ratos *Wistar* submetidos à lesão na mucosa oral e tratados com laser terapêutico vermelho (660 nm) contínuo nas doses de 4 e 20 J/cm² e potência de 40 mW. Para a dose de 4 J/cm² foi observado aumento da reepitelização e redução da área de lesão.

Apesar de inúmeros estudos mostrarem que o laser terapêutico atua de forma positiva no processo de reparo tecidual os resultados ainda são conflitantes possivelmente pela não padronização dos parâmetros de irradiação. Outro ponto importante é o momento que se inicia a irradiação uma vez que dependendo da fase de reparo que se encontra o tecido lesionado possivelmente a resposta do tecido ao tratamento com laser será diferente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se o momento de intervenção com o laser vermelho de baixa potência influencia no resultado final no processo de reparo tecidual em modelo de queimadura de segundo grau e se essa irradiação é capaz de alterar a expressão de genes envolvidos com o reparo do DNA em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a contração e reepitelização da área lesionada;
- b) Medir a espessura da epiderme e a área do tecido de granulação através da coloração de Hematoxilina & Eosina com auxílio do software Image J;
- c) Avaliar a reorganização das fibras colágenas através da coloração de Picro Sirius;
- d) Quantificar a expressão do colágeno tipo I, colágeno tipo III e TGF- β por Western Blotting;
- e) Quantificar o número de macrófagos através da imunohistoquímica para CD68;
- f) Quantificar a proliferação celular através da imunohistoquímica para células positivas para PCNA;
- g) Quantificar o número de miofibroblastos através da imunohistoquímica para α -actina de músculo liso;
- h) Quantificar o número de vasos positivos para α -actina de músculo liso através da imunohistoquímica;
- i) Avaliar o reparo por excisão de bases através da expressão dos genes OGG1 e APE1 por RT-PCR;
- j) Avaliar o reparo por excisão de nucleotídeos através da expressão dos genes XPA e XPC por RT-PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250-350 gramas (12 semanas) mantidos em condição padrão; acesso livre a água e ração acondicionados em sala com temperatura controlada (22°C) em um ciclo de 12 horas claro/escuro. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/023/2014).

3.2 Laser terapêutico

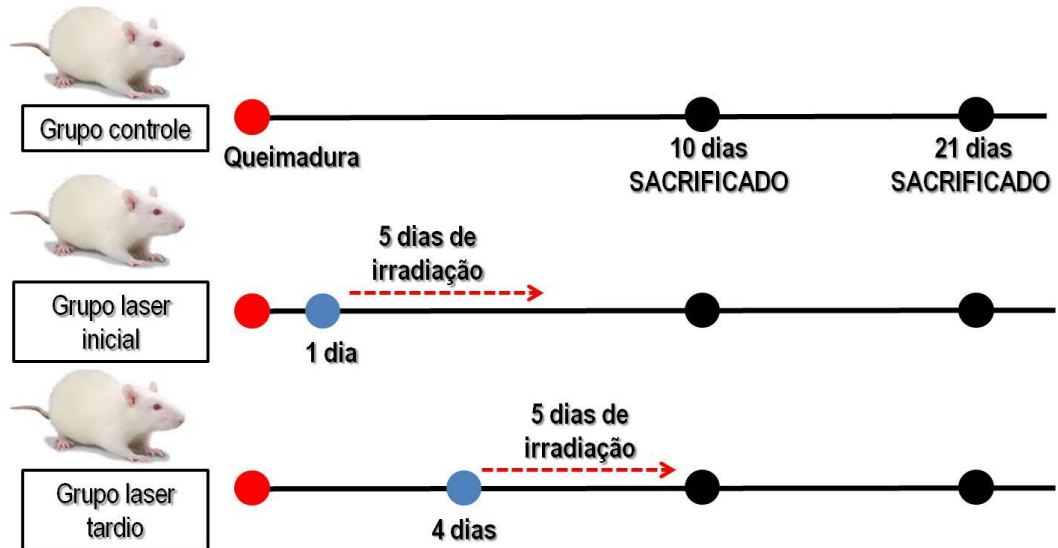
Para o estudo foi utilizado um laser de baixa de baixa potência (Photo Laser, AlGaInP, 100 mW), no modo de emissão contínuo e comprimento de onda de 660 nm. O equipamento foi adquirido da empresa DMC equipamentos Ltda (São Paulo, Brasil). O protocolo de irradiação utilizado foi o sugerido pelo fabricante (20 J/cm², 100 mW e modo contínuo) com *spot size* de 0,028 cm².

3.3 Desenho experimental

Os animais foram sedados por via intramuscular através de uma combinação de quetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). Em seguida os dorsos dos animais foram tricotomizados e divididos em da seguinte forma: *grupo controle* (n= 12) – os animais foram queimados e não irradiados, *grupo laser inicial* (n= 12) – os animais foram queimados e irradiados um dia após a queimadura por 5 dias consecutivos e *grupo laser tardio* (n= 14) – os animais foram queimados e irradiados 4 dias após a queimadura por 5 dias consecutivos conforme a figura 15. Uma transparência com quadrantes de 0,5 cm² de área e orifícios nos vértices desses quadrantes foi posicionada sob a lesão e a irradiação foi feita através desses

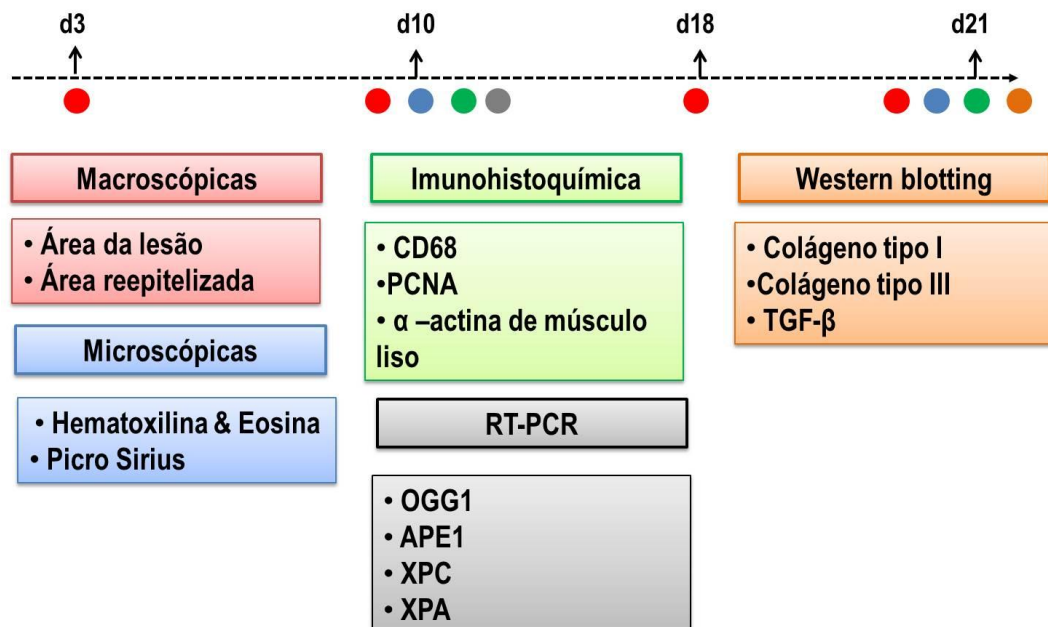
orifícios. Parte (n=18) dos animais foi eutanasiado em 10 dias após a lesão e a outra parte (n=20) foi eutanasiado com 21 dias após a lesão através da exposição ao CO₂ para análises posteriores conforme a figura 16.

Figura 15 – Desenho experimental



Legenda : Figura esquemática demonstrando o momento da intervenção do laser terapêutico em seus respectivos grupos.

Figura 16 – Análises realizadas no estudo



Legenda : Figura esquemática demonstrando as análises realizadas no estudo de forma cronológica.

3.4 Modelo de queimadura

O modelo de queimadura utilizado no presente estudo foi a queimadura de segundo grau, esta que é classificada sob o ponto de vista histológico quando a lesão induzida pela queimadura atinge a derme. Para indução da queimadura foi utilizado um variador de voltagem conectado através de um fio a um voltímetro e a uma haste metálica de 23 milímetros de diâmetro. Além disso, foi conectado um termômetro digital a uma das extremidades da haste metálica. Desta forma, foi ajustada uma voltagem de 70 volts obtendo um aquecimento da haste metálica de 80 °C. Uma vez obtendo esta temperatura o dorso do animal entrou em contato com a haste metálica por 15 segundos (52).

3.5 Análise macroscópica da lesão

Para análise macroscópica do fechamento e reepitelização da área queimada foi utilizada uma transparência colocada sobre a área queimada na qual foi contornado a borda da área da lesão e área reepitelizada com uma caneta nos dias 3, 10, 18 e 21 dias. As folhas de plástico foram digitalizadas e as áreas foram analisadas com auxílio do software Image J. Os dados foram expressos em porcentagem da área lesionado ou área reepitelizada.

3.6 Análises microscópicas

As amostras de pele correspondentes ao 10° e 21° dia após a queimadura foram cuidadosamente recolhidas a fim de incluir não só a área lesionada, mas também parte do tecido sadio adjacente. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado (pH 7,2), incluídos em parafina e cortes de 5µm foram feitos para análises histológicas. Foi realizada a coloração de Hematoxilina & Eosina para observação histopatológica do tecido, a mensuração da espessura da epiderme e a área do tecido de granulação com auxílio do software Image J. Os dados da espessura foram expressos em milímetros (mm) e a área do tecido de granulação foi expressa em micrômetro quadrado (µm²). As lâminas foram digitalizadas utilizando um

scanner de lâminas Panoramic MIDI digital. As imagens foram visualizadas através do software de análise de imagem (Panoramic Viewer, 3DHISTECH Kft). Além disso, foi realizado a coloração de Picro Sirius para observação das fibras colágenas sob luz polarizada através do microscópio Axiolab, Zeiss-Vision; câmera TecVoz; Sony Corporation; monitor CCE 14" LCD.

3.7 Western Blotting

Os fragmentos da lesão correspondente ao 21º dia foram congelados e posteriormente homogeneizados em tampão de lise. A concentração total de proteínas foi determinada de através do ensaio de ácido bicinlônico (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN). O lisado proteico (30 µg) em tampão de amostra foi separado em géis de poliacrilamida com SDS 8 ou 10% (SDS-PAGE) e em seguida transferidas para a membrana de PVDF. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em pó (Molico, São Paulo, Brasil) e incubadas com anticorpos primários policlonais anti-coelho para TGF-β 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Buffalo, NY / 1: 200), anti-coelho para colágeno tipo I (Millipore, Temecula, CA / 1: 500), anti-camundongo para colágeno tipo III (Millipore, Temecula, CA / 1: 600) e anti-β-actina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO / 1: 1000). Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1:100) ou anti-camundongo (1:100) conjugado a uma peroxidase (DAKO, Carpinteria CA). Os anticorpos foram detectados por quimiluminescência (Santa Cruz Biotechnology) e analisados a partir da densitometria das bandas através do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e os resultados foram expressos em unidade arbitrária.

3.8 Imunohistoquímica

Para quantificação de macrófagos positivos para CD68, proliferação celular, miofibroblastos e vasos positivos para α-actina de músculo liso, as lâminas histológicas foram incubadas com anticorpos anti-camundongo para CD68 (1:300; Serotec, Kidlington, UK), anti-antígeno nuclear para proliferação celular (DAKO; 1:1000) e anti-camundongo para α-

actina de músculo liso (1:1000; DAKO), respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada através da solução de tripsina 0.1% (Difco Laboratories, Detroit, MI) ou tampão citrato (pH 6.0) aquecidas a 70 °C por 30 minutos em estufa. Após recuperação as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio 3% para inibição das peroxidases endógenas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo primário overnight na geladeira. Após incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado a uma peroxidase através do sistema EnVision (DAKO). A diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno e os cortes foram contra-corados com hematoxilina.

As lâminas foram digitalizadas utilizando um scanner de lâminas Pannoramic MIDI digital. Para quantificação do número de células e vasos, 10 campos (70,000 μm^2) por animal foram capturados aleatoriamente através do software de análise de imagem (Pannoramic Viewer, 3DHISTECH Kft). Os dados foram expressos em número de células marcadas por milímetro quadrado.

3.9 Expressão de genes de reparo do DNA

3.9.1 Extração do RNA

As amostras de pele queimada correspondente ao 10º dia após a queimadura foram maceradas manualmente em um tubo de microcentrífuga com o reagente TRIzol[®] e centrifugada (12.000 x g, 4 ° C, 10 min). Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, adicionado clorofórmio e centrifugados novamente (12.000 x g, 4 ° C, 15 min). Em seguida, as fases aquosas foram transferidas para outros tubos e a estes foi adicionado isopropanol. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 4 ° C, 10 min). Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi lavado com uma solução de etanol e DEPC (80% de etanol, 0,1% DEPC) e centrifugado. Os sobrenadantes foram retirados e o RNA total foi reconstituído em solução (0,1%) de água com DEPC e armazenado a -80 ° C.

3.9.2 Síntese do DNA complementar

A concentração e pureza de RNA foram determinadas por espectrofotometria através da relação entre a densidade óptica e o comprimento de onda 260/280 nm. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através de um kit em duas etapas (Promega, EUA). Um micrograma de RNA foi transcrito em sentido inverso em cDNA usando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando um total de 20 uL por reação. A quantidade da cadeia de reação da polimerase em tempo real (RTqPCR) foi realizada utilizando 5 mL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega) para um volume final de 10 uL contendo 50 ng de ADNc. Para a determinação da quantidade relativa inicial de cDNA, as amostras foram amplificadas com 8-oxoguanina ADN glicosilase (OGG1), apurínico / endonuclease apirimidinico 1 (APE1), xeroderma pigmentoso A proteína (XPA), xeroderma pigmentoso proteína C (XPC), e gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH) iniciadores. As reações foram corridas no equipamento Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA). As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 ° C durante 10 min. O PCR consistiu em 40 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 94 ° C durante 30 s, emparelhamento a 60 ° C durante 30 s, e um período de extensão a 72 ° C durante 30 s. A análise das curvas de Melt foram realizadas para todos os genes e a especificidade e integridade dos produtos de PCR eram confirmada pela presença de um único pico. A expressão relativa foi normalizada pelos níveis do gene de referência (GAPDH) utilizando ratos do grupo controle. Os valores dos CTs (duplicatas) foram analisados através do software Microsoft Excel (Microsoft), utilizando o CT comparativo (2 Método $-\Delta\Delta CT$) (LIVAK; e cols; 2001).

3.10 **Análise estatística**

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise de variância de um critério (One-way ANOVA) foi utilizada para verificar possível diferença estatística entre os grupos, seguida de pós-teste de Bonferroni para verificar possível diferença entre os grupos tratados e o grupo controle. $p < 0,05$ foi considerado como menor nível de significância. A

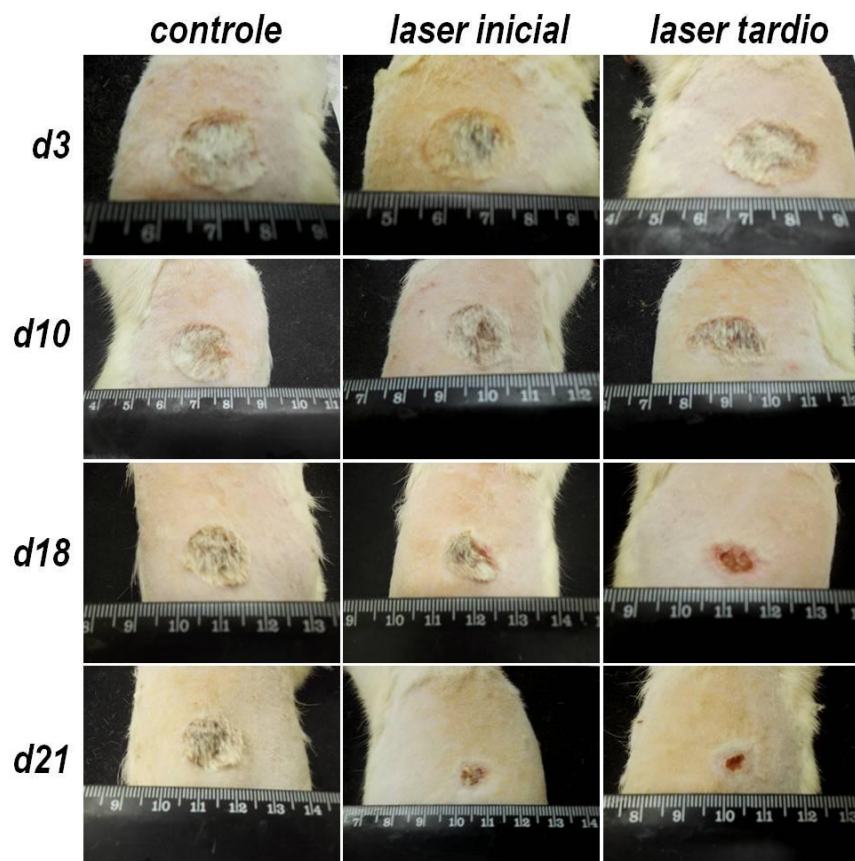
análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism version 5.00, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 Análises macroscópicas

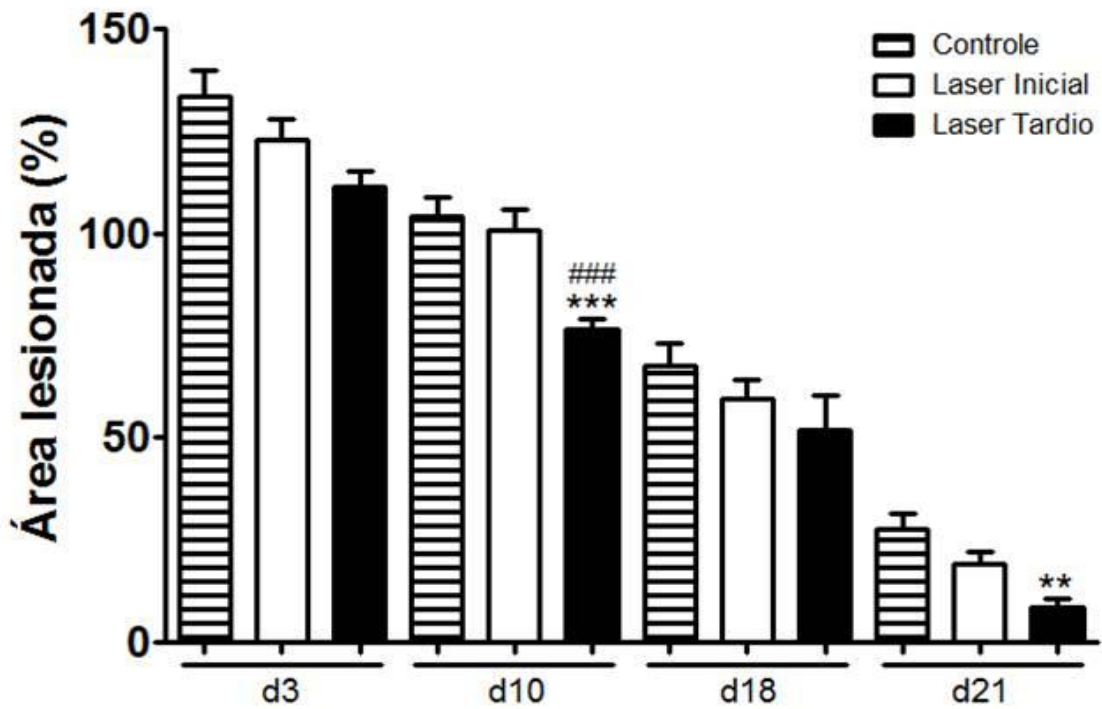
As imagens macroscópicas podem ser observadas na figura 17. Quanto à quantificação da área queimada, observou-se que o grupo laser tardio apresentou uma área queimada 36% menor no 10º dia ($p<0,001$) e 69% menor ($p<0,01$) no 21º dia após a queimadura comparada aos seus respectivos grupos controle. Além disso, observou-se uma diferença entre os grupos irradiados no 10º dia após a queimadura ($p<0,001$) (figura 18).

Figura 17 – Macroscopia da área queimada



Legenda: Macroscopia da área queimada em d3 (3 dias após a queimadura), d10 (10 dias após a queimadura), d18 (18 dias após a queimadura) e d21 (21 dias após a queimadura).

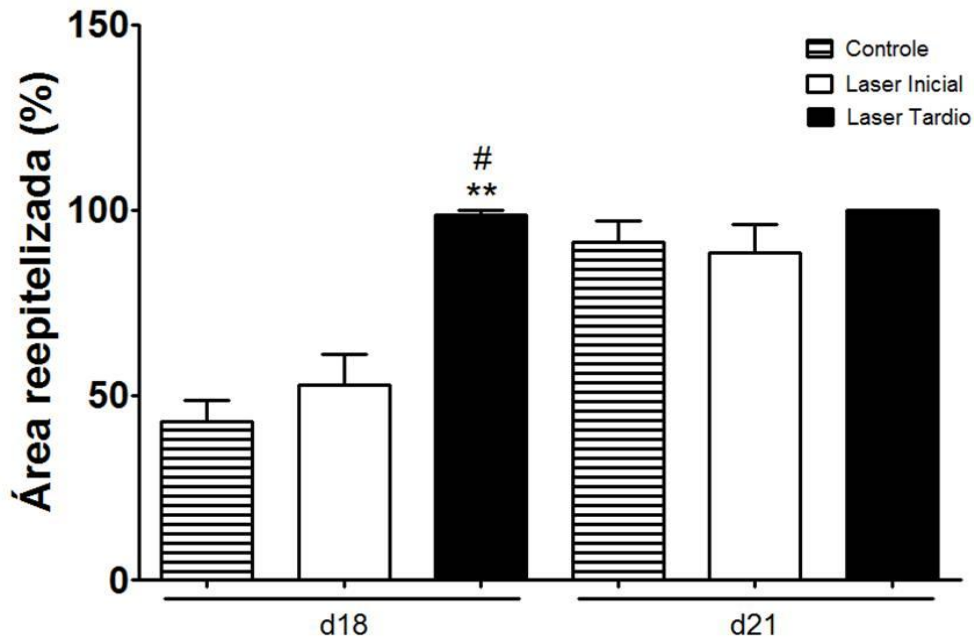
Figura 18 - Porcentagem da area inicial da lesão



Legenda: Porcentagem da área inicial da lesão em 3, 10, 18 e 21 dias após a queimadura. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; # # # $p < 0,001$ quando comparado o laser tardio ao grupo laser inicial.

Quanto à reepitelização, observou-se que o grupo laser tardio acelerou em 18% ($p < 0,01$) a reepitelização no 18º dia após a queimadura, quando comparado ao grupo controle e novamente observou-se resposta diferente entre os grupos irradiados 13% ($p < 0,05$) (figura 19).

Figura 19 - Porcentagem da área reepitelizada

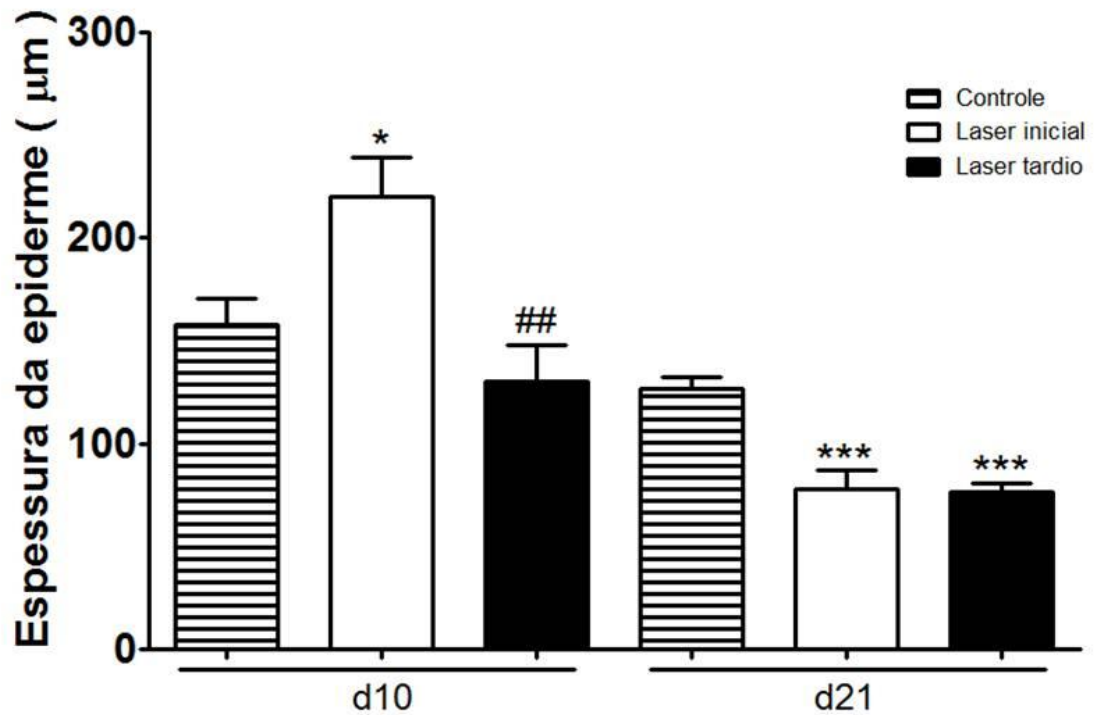


Legenda: Porcentagem da área reepitelizada em 18 e 21 dias após a queimadura. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ laser tardio comparado ao laser inicial.

4.2 Análises microscópicas

Com o intuito de quantificar a neoepiderme e o tecido de granulação na derme, os cortes foram corados em H&E, foram observadas através da microscopia de luz. Com relação à neoepiderme, observou-se no 10º dia um aumento de 40% no grupo laser inicial, quando comparado aos grupos controle ($p < 0,05$) e laser tardio ($p < 0,001$). Já no 21º dia após a queimadura, observou-se uma diminuição de 39% na espessura da neoepiderme em ambos os grupos irradiados quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 20).

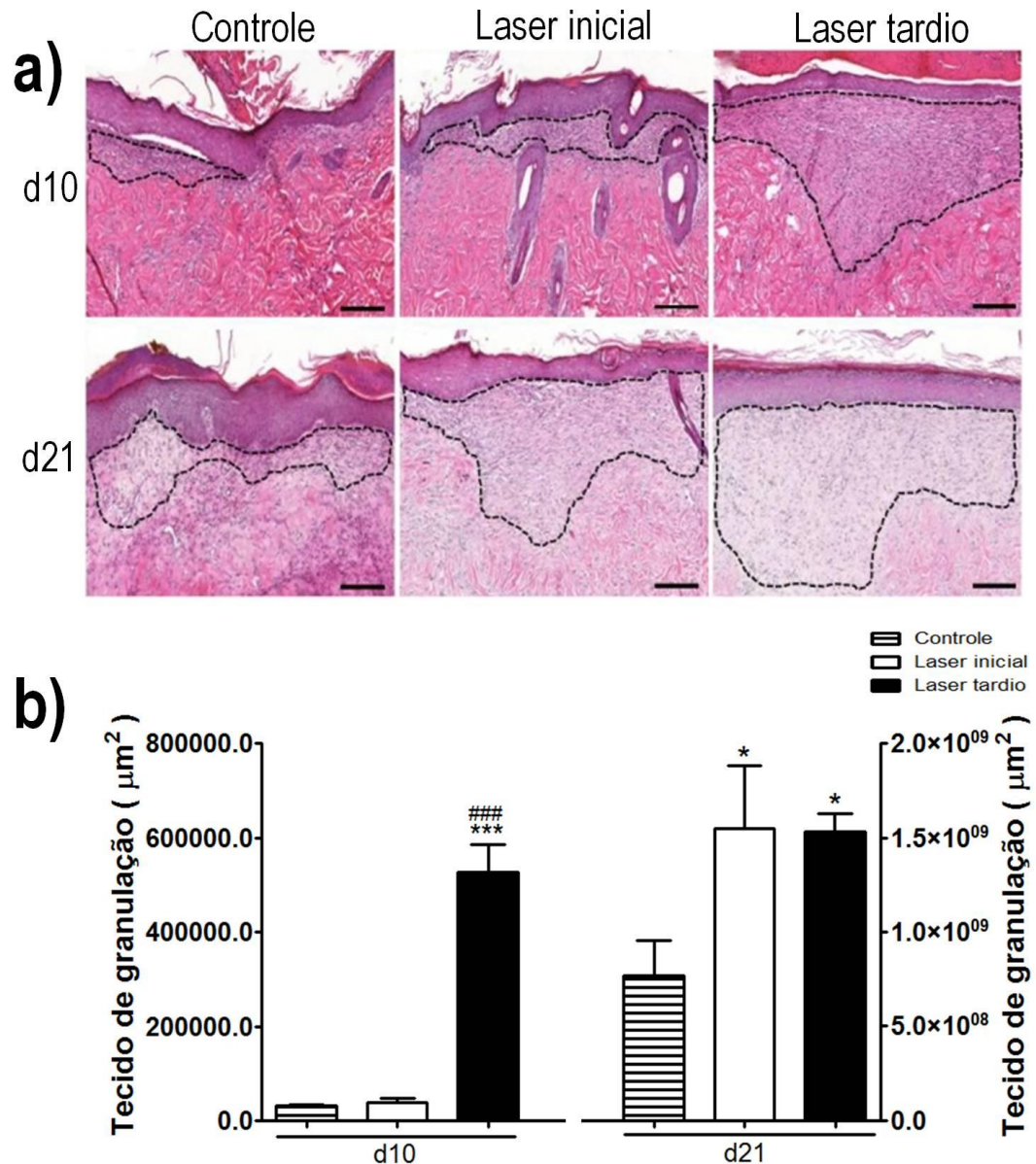
Figura 20 - Espessura da epiderme



Legenda: Espessura da epiderme 10 e 21 dias após a queimadura. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; ## $p < 0,01$ laser tardio comparado ao laser inicial.

Com relação ao tecido de granulação, observou-se no 10º dia após a queimadura no grupo laser tardio um aumento de 1515% quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) e de 1232% comparado ao grupo laser inicial ($p < 0,001$). Já no 21º dia após a queimadura, um aumento, tanto no grupo laser inicial (102%) quanto no grupo laser tardio (100%), foi observado ao serem comparados com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 21).

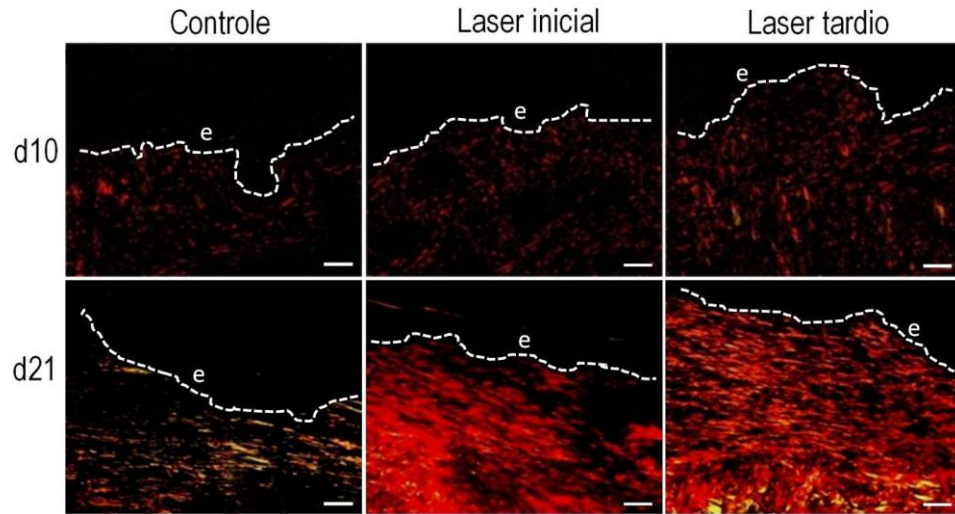
Figura 21 - Área do tecido de granulação



Legenda: Área do tecido de granulação em 10 e 21 dias após a queimadura. a) Coloração em hematoxilina & eosina no qual a linha tracejada indica o tecido de granulação; Barra - 200 μm . b) Representação gráfica da área de tecido e granulação. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; ### $p < 0,001$ laser tardio comparado ao laser inicial.

Através da coloração de Picro Sirius e analisadas com luz polarizada, observou-se um aumento da deposição de colágeno, em ambos os grupos irradiados quando comparados com o grupo controle. Esse aumento foi observado tanto no 10º dia quanto no 21º dia após a queimadura (Figura 22).

Figura 22 - Coloração de Picro Sirius

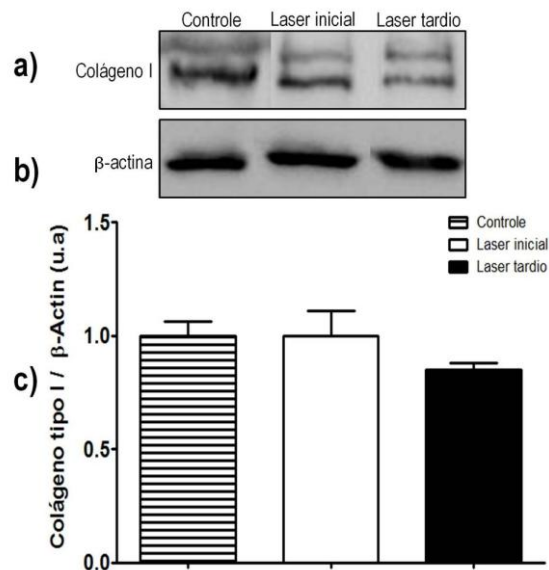


Legenda: Deposição de fibras colágenas em 10 e 21 dias após queimadura. Linha tracejada delimitando a epiderme (e) da derme. Barra de 100 μ m. Coloração de Picro Sirius.

4.3 Western Blotting

A expressão das proteínas foram avaliadas no 21º dia após a queimadura. Não foi observada diferença significativa na expressão do colágeno tipo I nos grupos irradiados comparados ao grupo controle; entretanto uma redução de 15% no grupo laser tardio, quando comparado ao grupo controle foi observado (figura 23).

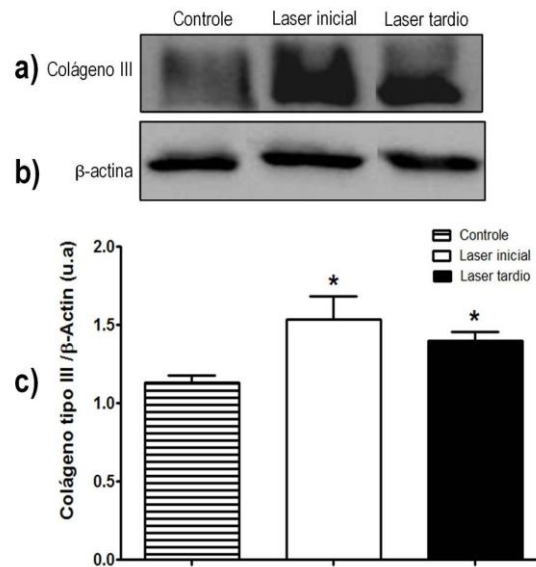
Figura 23 - Expressão proteica do colágeno tipo I



Legenda: Expressão proteica do colágeno tipo I 21 dias após a queimadura. a) colágeno tipo I; b) β -actina e c) representação gráfica. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

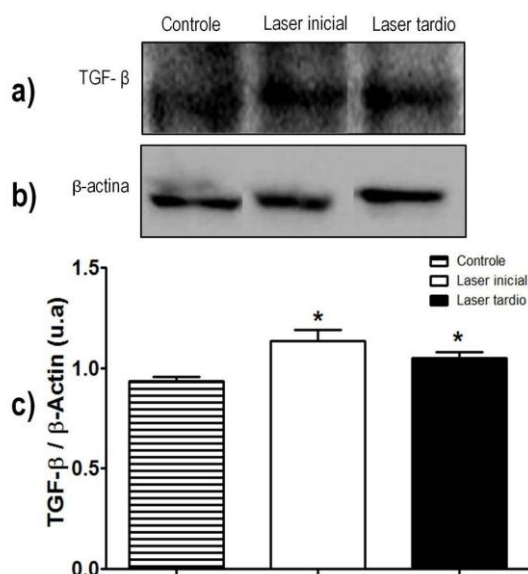
Com relação à expressão de colágeno tipo III, um aumento de 15% no grupo laser inicial e de 5% no grupo laser tardio, ambos comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 24).

Figura 24 - Expressão proteica do colágeno tipo III



Legenda: Expressão proteica do colágeno tipo III 21 dias após a queimadura. a) colágeno tipo III; b) β -actina e c) representação gráfica. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle.

Observou-se um aumento da expressão de TGF- β de 21% no grupo laser inicial e de 13% no grupo laser tardio, ambos comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 25).

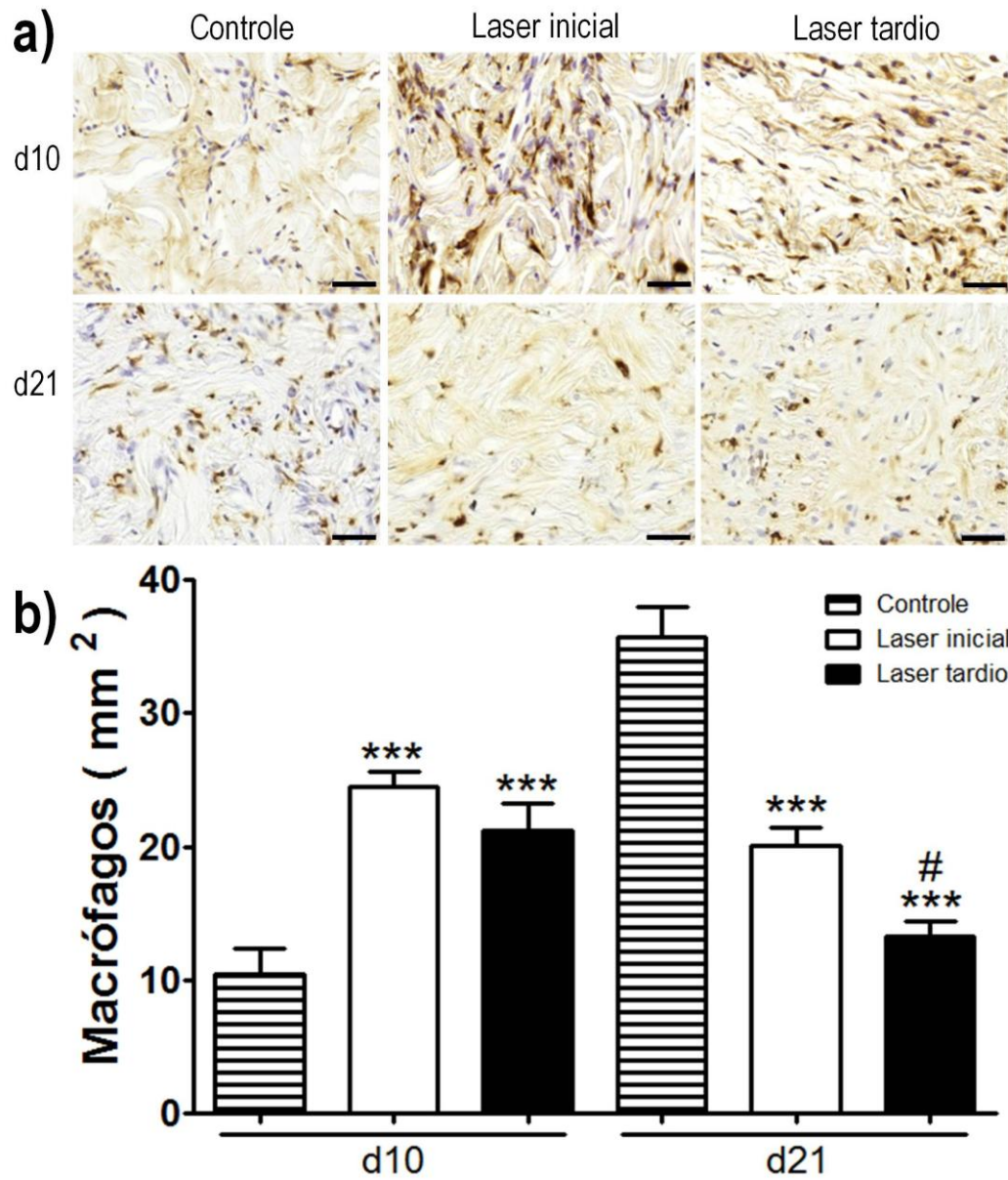
Figura 25 - Expressão proteica do TGF- β 

Legenda: Expressão proteica do TGF- β 21 dias após a queimadura. a) TGF- β ; b) β -actina e c) representação gráfica. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle.

4.4 Imunohistoquímica

Observou-se um aumento no número de macrófagos positivos para CD68 de 135% no grupo laser inicial e de 103% no grupo laser tardio no 10º dia após a queimadura, ambos comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Já no 21º dia após a queimadura, observou-se uma redução de 44% no grupo laser inicial e 63% no grupo laser tardio, ambos comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, observou-se uma diferença entre os grupos irradiados ($p < 0,05$) (figura 26).

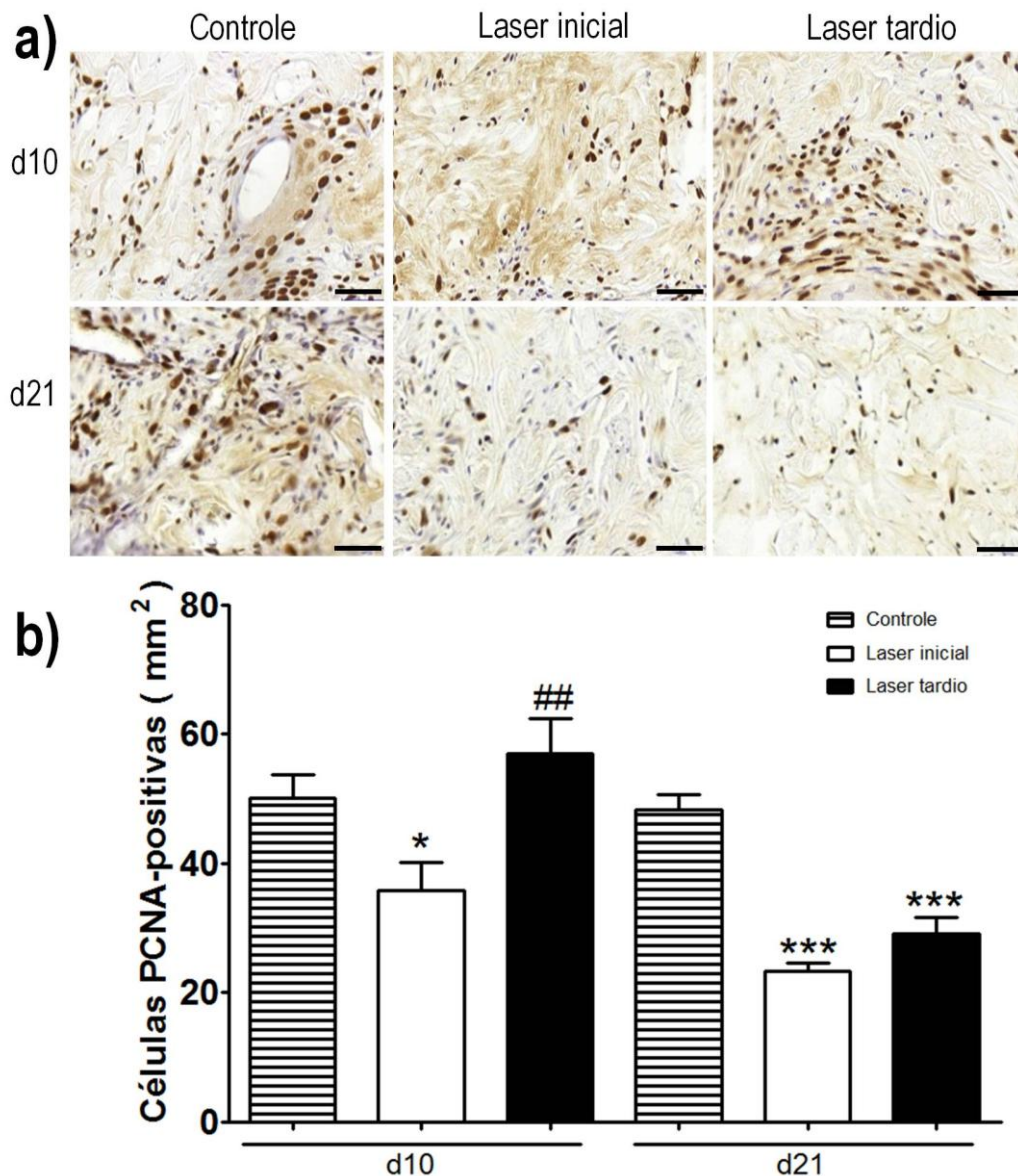
Figura 26 - Imunohistoquímica para macrófagos CD68



Legenda: Imunohistoquímica para macrófagos CD68 positivos 10 e 21 dias após a queimadura. a) Imunohistoquímica para macrófagos CD68 positivos; Barra de 50 μm . b) Representação gráfica do número de macrófagos. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ laser tardio comparado ao grupo laser inicial.

Observou-se uma diminuição de células PCNA positivas de 29% no grupo laser inicial comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e de 37% comparado ao grupo laser tardio ($p < 0,01$). Além disso, observou-se uma diferença entre os grupos irradiados ($p < 0,01$) no 10º dia após a queimadura. Já no 21º dia após a queimadura, observou-se uma redução tanto no grupo laser inicial (52%) quanto no grupo laser tardio (40%), ambos comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) (figura 27).

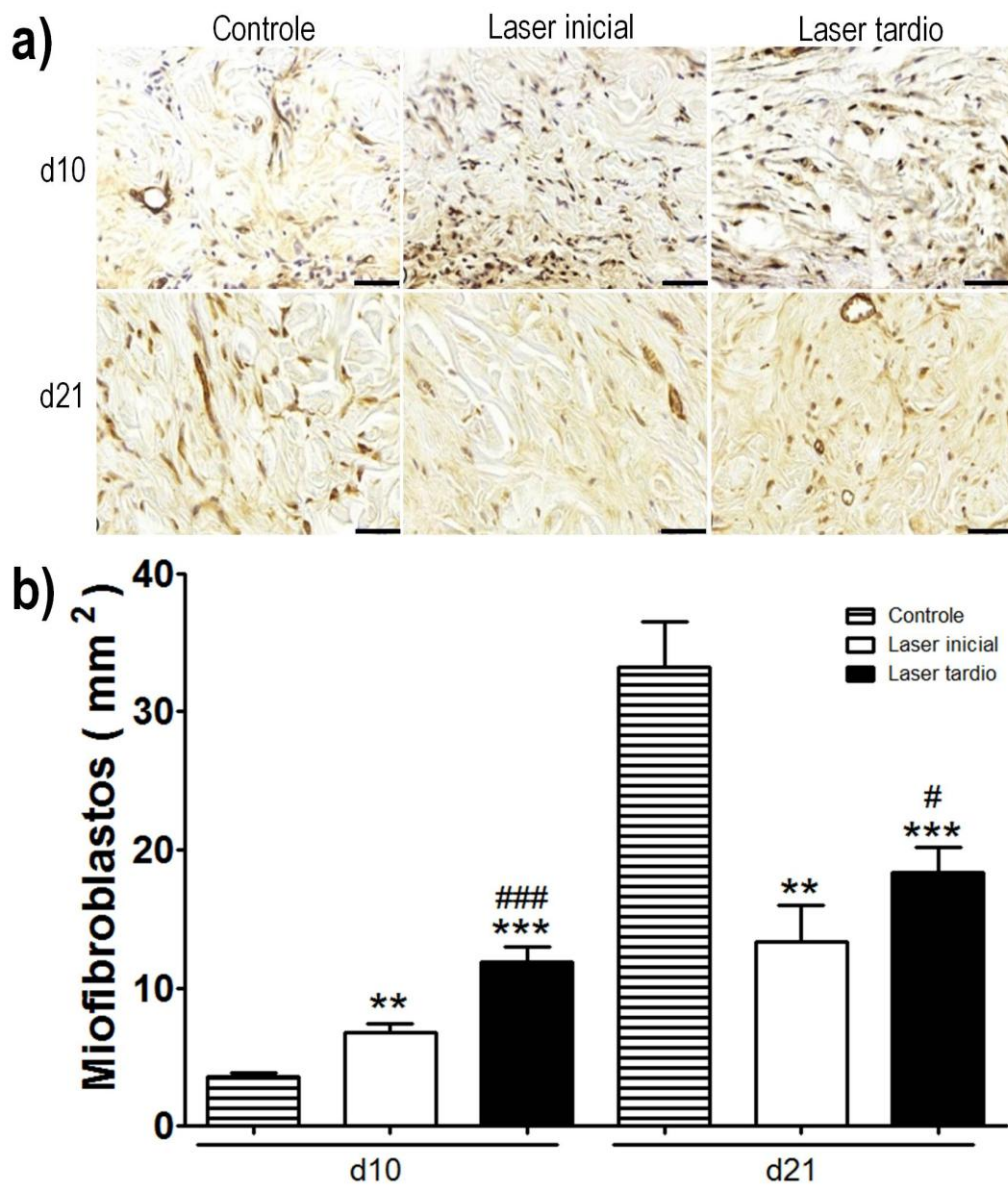
Figura 27 - Imunohistoquímica para células PCNA positivas



Legenda: Imunohistoquímica para células PCNA positivas 10 e 21 dias após a queimadura. a) Imunohistoquímica para células PCNA positivas; Barra de 50 μ m. b) Representação gráfica do número de células PCNA positivas. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; ## $p < 0,01$ laser tardio quando comparado ao grupo laser inicial.

Observou-se um aumento de miofibroblastos de 91% no grupo laser inicial ($p < 0,01$) e de 237% no grupo laser tardio ($p < 0,001$), ambos comparados ao grupo controle. Além disso, observou-se uma diferença entre os grupos irradiados ($p < 0,001$) no 10º dia após a queimadura. Já no 21º dia após a queimadura, observou-se uma redução de 60% no grupo laser inicial ($p < 0,01$) e de 45% no grupo laser tardio ($p < 0,001$), ambos comparados ao grupo controle, além disso, observamos uma diferença entre os grupos irradiados ($p < 0,05$) (figura 28).

Figura 28 - Imunohistoquímica para miofibroblastos

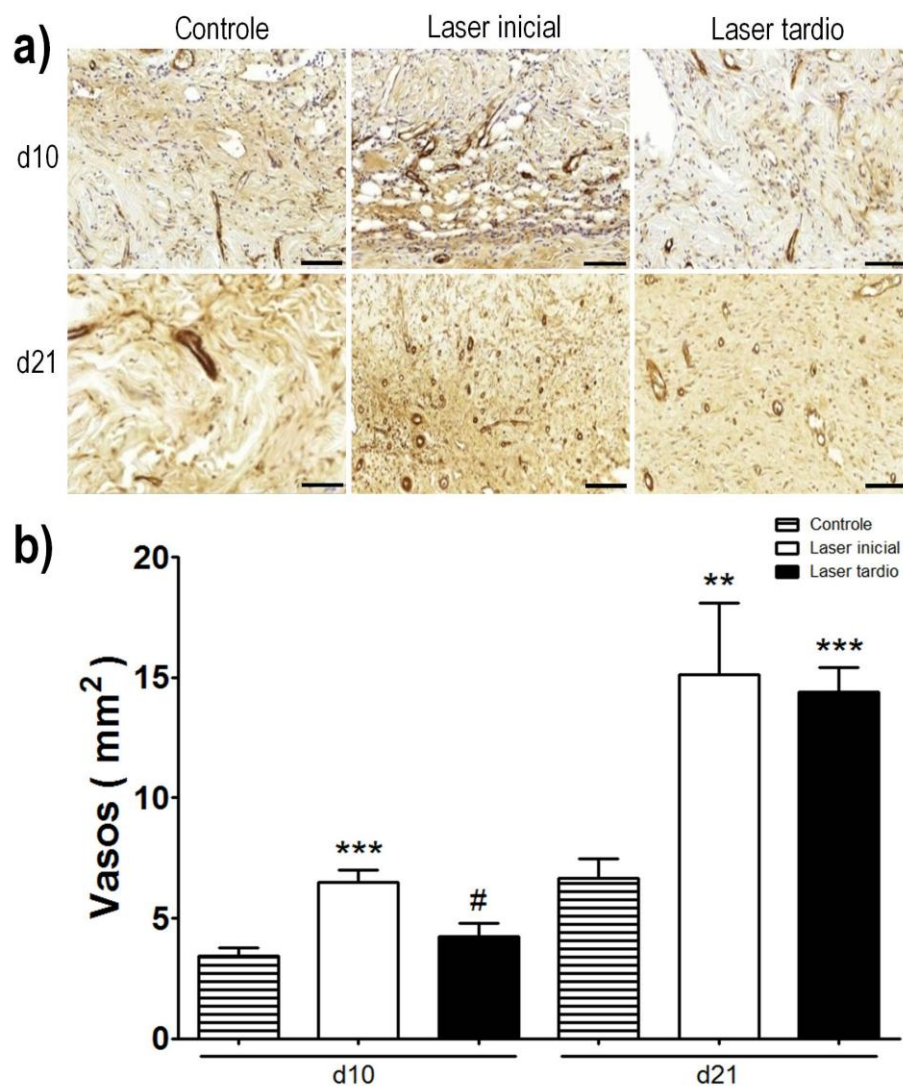


Legenda: Imunohistoquímica para miofibroblastos 10 e 21 dias após a queimadura. a) Imunohistoquímica para miofibroblastos positivos para α -actina de músculo liso; Barra de 50 μ m. b) Representação gráfica do número de miofibroblastos. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao

grupo controle; # $p < 0,05$ laser tardio comparado ao grupo laser inicial; ### $p < 0,001$ laser tardio comparado ao grupo laser inicial.

Observou-se um aumento de vasos positivos para α -actina de músculo liso de 91% no grupo laser inicial comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) e aumento de 55% comparado ao grupo laser tardio ($p < 0,001$) no 10º dia após a queimadura. Já em 21º dias após a queimadura, observou-se um aumento de 129% no grupo laser inicial ($p < 0,01$) e de 118% no grupo laser tardio ($p < 0,001$) ambos comparado ao grupo controle (figura 29).

Figura 29 - Imunohistoquímica para vasos positivos para α -actina de músculo liso

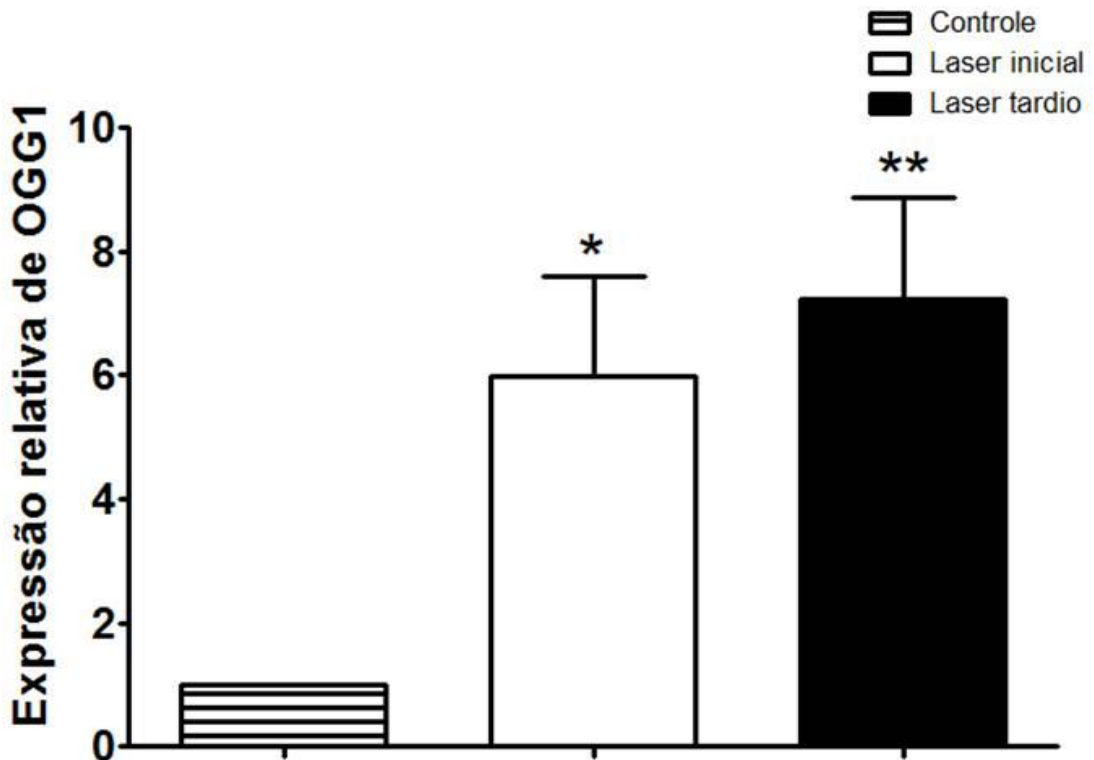


Legenda: Imunohistoquímica para vasos positivos para α -actina de músculo liso 10 e 21 dias após a queimadura. a) Imunohistoquímica para α -actina de músculo liso; Barra de 50 μm . b) Representação gráfica do número de vasos. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ laser tardio comparado ao grupo laser inicial.

4.5 Avaliação da expressão dos genes de reparo do DNA

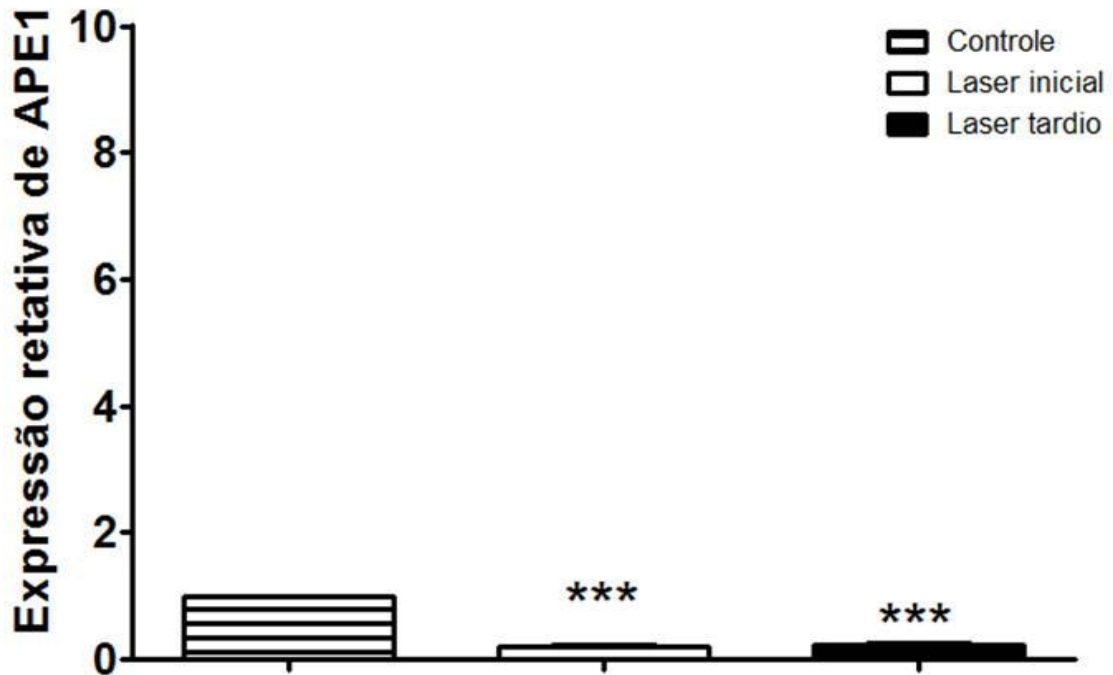
A expressão dos genes que codificam duas proteínas envolvidas no reparo por excisão de bases foram investigadas, a OGG1 e a APE1. Observou-se um aumento da expressão de OGG1 de 490% no grupo laser inicial ($p < 0,05$) e de 620% no grupo laser tardio ($p < 0,01$), ambos comparados ao grupo controle (figura 30). Observou-se uma redução de 80% da APE1 tanto no grupo laser inicial quanto no grupo laser tardio ($p < 0,001$), ambos comparados ao grupo controle (figura 31).

Figura 30- Expressão relativa do RNA mensageiro de OGG1



Legenda: Expressão relativa do RNA mensageiro de OGG1 após 10 dias da queimadura na pele de ratos *Wistar* submetida à lesão de segundo grau por queimadura. Os dados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle.

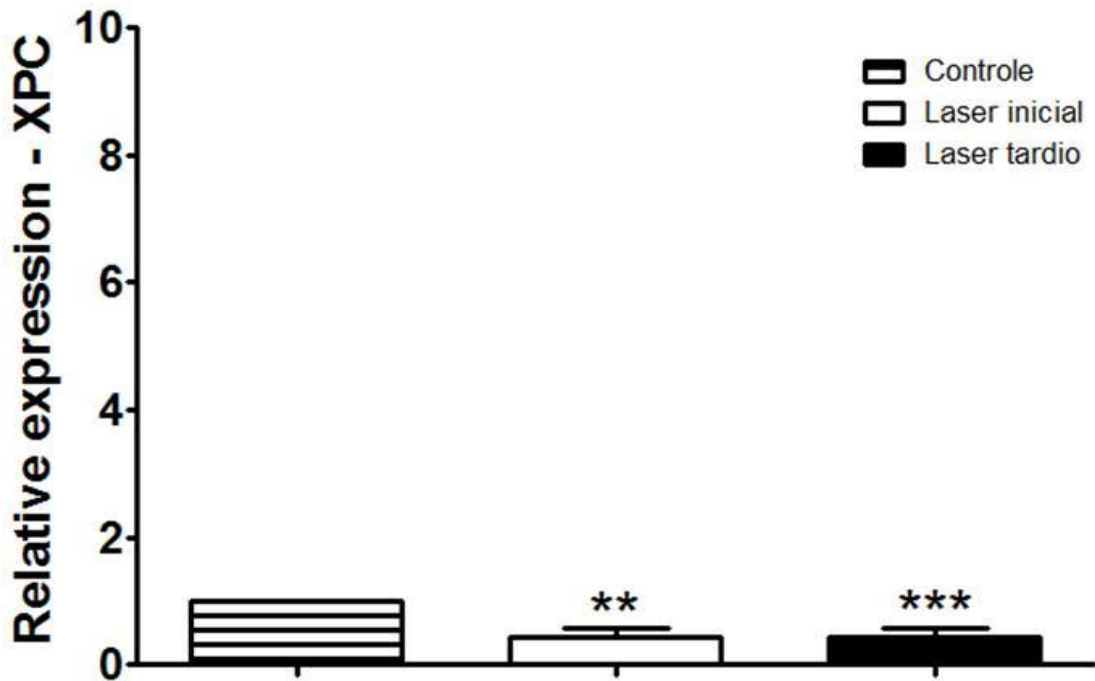
Figura 31 - Expressão relativa do RNA mensageiro de APE1



Legenda: Expressão relativa do RNA mensageiro de APE1 após 10 dias da queimadura na pele de ratos *Wistar* submetida à lesão de segundo grau por queimadura. Os dados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle.

A expressão dos genes que codificam duas proteínas envolvidas no reparo por excisão de nucleotídeos foram investigadas, a XPC e a XPA. Observou-se uma diminuição de 60% da XPC tanto no grupo laser inicial ($p < 0,01$) quanto no grupo laser tardio ($p < 0,001$), ambos comparados ao grupo controle (figura 32). Observou-se um aumento de XPA de 40% no laser inicial e de 50% no laser tardio, ambos comparados ao grupo controle (figura 33).

Figura 32 - Expressão relativa do RNA mensageiro de XPC



Legenda: Expressão relativa do RNA mensageiro de XPC após 10 dias da queimadura na pele de ratos *Wistar* submetida à lesão de segundo grau por queimadura. Os dados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle; *** $p < 0,001$ grupo irradiado quando comparado ao grupo controle.

Figura 33 - Expressão relativa do RNA mensageiro de XPA



Legenda: Expressão relativa do RNA mensageiro de XPA após 10 dias da queimadura na pele de ratos *Wistar* submetida à lesão de segundo grau por queimadura. Os dados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

Embora a compreensão sobre o laser terapêutico vermelho de baixa potência seja cada vez maior, os resultados ainda são conflitantes, tanto pela ausência de consenso nos protocolos clínicos, quanto pelo grande número de parâmetros de ajuste do equipamento como: comprimento de onda, potência, fluência e modo de emissão (53, 6, 54). Entretanto, alguns equipamentos sugerem protocolos de irradiação para determinadas patologias, mas sem embasamento científico claro (6). Em nosso estudo foi utilizado um equipamento de uso clínico e as condições de irradiação foram aquelas em protocolo sugerido pelo fabricante para o tratamento de queimaduras.

Nossos resultados mostram que o laser terapêutico vermelho acelerou o fechamento da lesão após 10 e 21 dias da queimadura, principalmente no grupo laser tardio. A contração da ferida ocorre principalmente pela ação dos miofibroblastos (55), que atuam de forma mecânica aproximando as bordas da lesão (23). A expressão de α -actina de músculo liso e desmina se iniciam a partir do 6º dia após a lesão (15), justamente no momento em que o grupo laser tardio estava sendo irradiado. É possível que o laser tenha potencializado a ação dos miofibroblastos e conseqüentemente repercutido de forma positiva na contração da lesão por ter iniciado neste período.

A migração e a proliferação de queratinócitos ocorrem conjuntamente com a contração da lesão, refletindo na neoepiderme, a qual fica mais espessa na fase inicial da lesão e tende a ficar mais delgada com a resolução do processo de reparo (15). Desta forma, constitui-se um bom indicativo de evolução do processo de reparo cutâneo. BASSO e colaboradores (56) realizaram um estudo *in vitro* no qual foi observado aumento no metabolismo de queratinócitos após irradiação com laser terapêutico infravermelho (780 nm), potência de 40 mW e fluências a partir de 0,5 J/cm². O presente estudo mostrou um aumento da espessura da epiderme após 10 dias da queimadura no laser inicial e redução da mesma em ambos os grupos irradiados após 21 dias da queimadura.

Outro parâmetro do processo de reparo cutâneo investigado foi o tecido de granulação, que consiste em um novo tecido formado no local da lesão. O presente estudo mostrou um aumento importante da área do tecido de granulação após 10 dias da queimadura no grupo laser tardio e aumento de ambos os grupo irradiados em após 21 dias da queimadura. Nossos resultados corroboram com os de MEIRELES e colaboradores (57), que observaram aumento moderado do tecido de granulação em ratos diabéticos submetidos a queimadura de 3º grau e

irradiados com laser 660 nm após 21 dias da queimadura. Uma possível hipótese que explique a diferença observada após 10 dias da queimadura na área do tecido de granulação pode ser o momento em que se iniciou a irradiação, uma vez que a irradiação do grupo laser tardio se iniciou justamente durante a fibroplasia (formação do tecido de granulação) e o laser inicial da fase inflamatória. Isso sugere que o a formação do tecido de granulação do grupo laser tardio seja um somatório do potencial bioestimulatório do laser com a resposta fisiológica do organismo e que no laser inicial seja mais uma resposta fisiológica do organismo.

Através da coloração de Picro Sirius o presente estudo observou um aumento na deposição de fibras colágenas em ambos os grupos irradiados, principalmente após 21 dias da queimadura. Além disso, estas fibras se apresentavam mais organizadas quando comparadas com 10 dias após a queimadura. Quanto ao tipo de colágeno depositado, não observamos diferença significativa na expressão do colágeno tipo I, porém, um aumento significativo do colágeno tipo III foi observado em ambos os grupos irradiados 21 dias após a queimadura. Nossos resultados estão de acordo com os resultados reportados por FIÓRIO e colaboradores (58), que observaram predomínio do colágeno tipo III em ratos submetidos à queimadura de 3º grau e tratados com laser 16 dias após a queimadura. Além disso, os resultados mostram que o aumento da expressão de colágeno tipo III é acompanhado pela expressão de TGF- β . O TGF- β é um fator de crescimento responsável por estimular a síntese de colágeno pelos fibroblastos (59). Em um processo de reparo tecidual, geralmente o colágeno tipo III é depositado nas fases iniciais do processo de reparo e, nas fases mais tardias, esse colágeno é substituído pelo colágeno tipo I (60). Essa mudança no perfil de fibras colágenas se faz a fim de proporcionar maior resistência à cicatriz (27). Assim, essa substituição é fundamental para conferir resistência à região da cicatriz. Desta forma, o laser terapêutico apresentou um papel bioestimulatório, induzindo a deposição de colágeno tipo III, que mais tarde será substituído por colágeno tipo I.

REDDY e colaboradores (53) sugerem que o momento da intervenção com laser terapêutico é crucial na resolução do processo de reparo tecidual em especial nas fases inflamatória e proliferativa. Estudos têm sugerido que o laser terapêutico possui o potencial de modular mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios durante o processo de reparo tecidual (61,62). Sugerem ainda que os macrófagos desempenham um papel importante nas fases iniciais desse processo, indo além da sua capacidade fagocitária e que a sua depleção poderia interferir em processos, como reepitelização, angiogênese e contração da lesão (63,64,65). Em nosso estudo, observou uma modulação positiva do laser terapêutico no número de macrófagos 10 dias após a queimadura, principalmente no grupo laser inicial,

possivelmente por este ter sido irradiado durante a fase inflamatória. Já no grupo laser tardio, como a duração das fases do processo de reparo tecidual em queimaduras é um pouco maior, é possível que a irradiação do grupo laser tardio tenha ocorrido no final da fase inflamatória e assim estimulado parcialmente os macrófagos. Já com 21 dias após a queimadura, observamos uma redução do número de macrófagos sugerindo que a resolução na lesão está em andamento uma vez que a fase final do processo de reparo é caracterizada pela redução da celularidade.

TSAI e colaboradores (66) observaram aumento da expressão de PCNA em cultura primária de tenócitos após irradiação com laser terapêutico 660 nm a partir de 1 J/cm^2 . CHEN e colaboradores (27) observaram também em cultura primária de tenócitos aumento da expressão de PCNA 24 horas após a irradiação com laser terapêutico 904 nm. GUPTA e colaboradores (67) observaram em camundongos Balb/C submetidos à lesão cutânea e tratados com laser terapêutico nos comprimentos de onda 635, 730, 810 e 980 nm com fluências constantes de 4 J/cm^2 e potência de 10 mW um aumento da expressão de PCNA somente em 810 nm. No presente estudo observamos uma redução de células PCNA positiva no grupo laser inicial já em 10 dias após queimadura e redução de ambos os grupos irradiados 21 dias após a queimadura. Como o grupo laser inicial foi submetido à irradiação no dia seguinte a lesão, é possível que o aumento da proliferação celular tenha ocorrido durante a irradiação e com o término da mesma a proliferação diminuiu conforme observado. Já no grupo laser tardio como a irradiação se encerrou mais próximo da eutanásia é possível que o potencial bioestimulatório do laser ainda estivesse aumentando a proliferação celular. Já em 21 dias após a queimadura observa-se uma redução esperada de células PCNA positivas uma vez que com a proximidade da resolução da lesão a celularidade é diminuída.

Desde a década de 70 o conhecimento sobre a biologia dos miofibroblastos tem aumentado consideravelmente, sendo assim implicado não só na fisiopatologia de algumas doenças, mas também na cicatrização de feridas (24). RIBEIRO e colaboradores (68) observaram aumento no número de miofibroblastos em ratos submetidos à lesão cutânea e tratados com laser 660 nm já a partir do 8º dia. MEDRADO e colaboradores (69) observaram em ratos *Wistar*, submetidos a lesão na pata traseira e tratados com laser terapêutico 670 nm, um aumento do número de miofibroblastos já a partir do 3º dia após a cirurgia. O presente estudo observou um aumento no número de miofibroblastos nos grupos irradiados 10 dias após a queimadura e redução e 21 dias após a queimadura. Possivelmente esse aumento no 10º dia seja decorrente da ação contrátil dos miofibroblastos, com a finalidade de fechar a lesão. Já a redução em 21º dia seja um reflexo da lesão estar completamente fechada. Esse

aumento no número de miofibroblastos nos grupos irradiados proporcionou uma aceleração no tempo de fechamento da lesão conforme observado na análise macroscópica da lesão.

A formação de vasos no leito da lesão é fundamental para dar suporte sanguíneo a matriz que está sendo formada e que algumas células importantes no processo de reparo cheguem a essa matriz (25). O presente estudo observou um aumento no número de vasos, principalmente 21 dias após a queimadura. Nossos resultados corroboram com o estudo de NÚÑEZ e colaboradores (1) no qual observaram resultados semelhantes em ratos submetidos a queimadura e tratados com laser 660 nm em 21 dias após a queimadura. Além disso, CHIAROTTO e colaboradores (70) mostraram que o laser terapêutico 670 e 830 nm foram capazes de aumentar a expressão de VEGF em modelo de queimadura de 2º grau. MEDRADO e colaboradores (71) observaram através de imunohistoquímica para α -actina de músculo liso e microscopia eletrônica de transmissão que o laser terapêutico 670 nm aumentou a proliferação e migração de pericitos em modelo de lesão cutânea. Nas fases finais no processo de reparo costuma-se observar uma redução no número de vasos uma vez que o reparo está sendo finalizado, o fato do número de vasos ainda estar aumentado sugere que o processo de reparo cutâneo ainda não está finalizado, mas que o laser terapêutico favoreceu na formação desses vasos no local da lesão.

Grande parte dos estudos tem buscado investigar somente os benefícios do laser terapêutico em diversas condições patológicas, porém, os possíveis efeitos adversos são igualmente importantes. Ainda mais em se tratando de um recurso terapêutico que, apesar da ampla aplicação clínica, ainda tem seus efeitos benéficos questionados. Recentemente alguns poucos estudos têm sugerido que a irradiação com laser terapêutico pode ter alguma ação no DNA, tanto em células eucarióticas (72), quanto em células procarióticas (73).

O reparo por excisão de bases é uma via importante do reparo de DNA agindo sobre lesões oxidativas causadas pelo ataque de radicais livres sob o DNA (32). OGG1 é uma DNA glicosilase envolvida na identificação e remoção de um produto da oxidação da guanina, a 8-oxoguanina (74). O presente estudo observou um aumento significativo na expressão relativa do mRNA da OGG1 nos grupo irradiados após 10 dias da queimadura. A queimadura envolve uma cascata de eventos dentre eles a geração de espécies reativas de oxigênio (75). Por outro lado, a citocromo c oxidase é um cromóforo capaz de absorver energia luminosa dentro do espectro vermelho e infravermelho levando a um aumento do metabolismo celular e por consequência formação de espécies reativas de oxigênio (45). É possível que o aumento observado na expressão de OGG1 seja reflexo da geração de espécies reativas de oxigênio induzida no tecido pela queimadura, bem como aos radicais livres produzidos como uma das

consequências do aumento da atividade da citocromo c oxidase pela exposição ao laser vermelho de baixa potência potencializando o efeito.

A APE1 é uma endonuclease responsável por clivar a ligação fosfodiéster na região danificada para inserção de uma nova base nitrogenada (29). DE SOUZA DA FONSECA e colaboradores (72) investigaram a expressão relativa de OGG1 e APE1 na pele e no músculo sádios em ratos submetidos a irradiação com laser terapêutico infravermelho. O estudo demonstra que a expressão relativa desses genes se comporta de diferente e que a expressão varia de acordo com os parâmetros de irradiação como potência, fluência e modo de emissão. Nesse estudo ainda observa-se uma diminuição na expressão relativa do mRNA da APE1 nos grupos irradiados 10 dias após a queimadura. Como a APE1 não é uma endonuclease exclusiva do reparo por excisão de bases é possível que esta esteja sendo recrutada por outras vias de reparo do DNA que não foram investigadas pelo presente estudo. Outra hipótese é que o reparo por excisão de bases não esteja sendo finalizado, uma vez que a 8-oxiguanina esteja sendo removida, mas como a estrutura do DNA não foi clivada uma nova base não será inserida no sítio apurínico/apirimidínico.

O reparo por excisão de nucleotídeos é uma via de reparo do DNA responsável pela reparação dos dímeros de pirimidina causados principalmente pela radiação ultravioleta (76) e agentes oxidantes como radicais livres (77). Nesta via, a proteína XPC faz parte do complexo de reconhecimento da lesão (78), enquanto a proteína XPA está envolvida na etapa de pré-incisão, estabilizando este segmento juntamente com outras proteínas (79). Apesar de não ser significativo, no presente estudo foi observado aumento da expressão relativa do mRNA da XPA nos grupos irradiados 10 dias após a queimadura. Esta tendência de aumento pode estar relacionada a uma resposta adaptativa da queimadura a exposição ao laser terapêutico, uma vez que estudos sugerem que células expostas à irradiação com laser terapêutico são mais resistentes a agentes genotóxicos como radiação gama (80) e radiação ultravioleta (81). No entanto, a exposição ao laser terapêutico reduziu a expressão relativa do mRNA da XPC em ambos os grupos irradiados 10 dias após a queimadura. Além da reparação dos dímeros de pirimidina o reparo por excisão de nucleotídeos é conhecido por atuar em danos agrupados no DNA (82). É possível que a radiação laser vermelho em fluência terapêuticas não tenha energia suficiente para induzir danos em nucleotídeos, apesar da tendência de aumento de XPA.

O presente estudo se destaca por utilizar parâmetros físicos do feixe de radiação laser que são sugeridos em protocolos clínicos, diferentemente da maioria dos estudos que não deixam claro os critérios utilizados para a escolha dos parâmetros de irradiação. Apesar das

limitações quanto à comparação dos estudos com animais e humanos, utilizar parâmetros clínicos em estudos experimentais torna mais fácil uma possível extrapolação dos resultados, tanto do ponto de vista do reparo tecidual, quanto do reparo do DNA. O fato de o estudo investigar se o momento da exposição ao laser terapêutico vermelho interfere no resultado final da lesão também é um ponto bastante positivo, uma vez que ocorre grande variação no momento em que o paciente queimado procura a assistência médica. Além disso, a investigação de possíveis efeitos adversos a nível molecular é fundamental para a obtenção de doses seguras e com o maior potencial de induzir efeitos desejados, levando a uma dosimetria adequada.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a exposição ao laser terapêutico vermelho de baixa intensidade favorece o processo de reparo tecidual no modelo de queimadura de segundo grau, principalmente quando a exposição ocorre durante a fase proliferativa, sugerindo que o momento da intervenção é crucial no resultado final da lesão. Em contrapartida, o estudo mostrou que a exposição a esta radiação induz alterações na expressão de genes envolvidos no reparo do DNA, sugerindo que uma dosimetria acurada deve ser obtida em protocolos terapêuticos baseados em lasers de baixa intensidade, evitando assim efeitos indesejados.

REFERÊNCIAS

1. Nunez SC, Franca CM, Silva DF, Nogueira GE, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers Med Sci*. 2013 Feb;28(2):633-41.
2. Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg*. 2004 Apr;22(2):111-7.
3. 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 Mar;31(3):334-40.
4. Martin LM, Marples B, Lynch TH, Hollywood D, Marignol L. Exposure to low dose ionising radiation: Molecular and clinical consequences. *Cancer Lett*. 2014 Jul 10;349(1):98-106.
5. de Souza da Fonseca A, Mencialha AL, Araujo de Campos VM, Ferreira Machado SC, de Freitas Peregrino AA, Geller M, et al. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. *Lasers Med Sci*. 2013 Jul;28(4):1077-84.
6. da Fonseca Ade S, Presta GA, Geller M, de Paoli F, Valenca SS. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):211-7.
7. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the World. Part II: intentional burns in adults. *Burns*. 2012 Aug;38(5):630-7.
8. Burn incidence and treatment in the United States: 2012 fact sheet; 2012.[Internet]. [acesso em 2014 out. 07]. Disponível em: www.ameriburn.org/resources_factsheet.php.
9. Karami Matin B, Karami Matin R, Ahmadi Joybari T, Ghahvehei N, Haghi M, Ahmadi M, et al. Epidemiological data, outcome, and costs of burn patients in Kermanshah. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012 Dec 31;25(4):171-7.
10. Sociedade Brasileira de Epidemiologia: 2004 fact sheet; 2014 [Internet]. [acesso em 2014 out. 07]. Disponível em: <http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-sao-a-quarta-maior-causa-de-morte-entre-as-criancas/>
11. Liu X, Kruger P, Maibach H, Colditz PB, Roberts M. Using skin for drug delivery and diagnosis in critically ill. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Oct 8.
12. ROSS, Michael H. & ROWRELL, Lynn J. *Histologia Texto e Atlas*. 2ª Edição. São Paulo, Editora Médica Panamericana. 1993. Pp. 123:129.
13. JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 2013. p. 100:108.

14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21.
15. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007 Jan-Feb;25(1):9-18.
16. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):35-43.
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):738-46.
18. Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF-beta regulation and wound healing. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):16257-69.
19. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):753-62.
20. Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Leg Med (Tokyo)*. 2014 Jan;16(1):8-13.
21. Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Jan;66(1):1-10; quiz 1-2.
22. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
23. Agha R, Ogawa R, Pietramaggiore G, Orgill DP. A review of the role of mechanical forces in cutaneous wound healing. *J Surg Res*. 2011 Dec;171(2):700-8.
24. Darby IA, Laverdet B, Bonte F, Desmouliere A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:301-11.
25. Sonnemann KJ, Bement WM. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:237-63.
26. Ehrlich HP, Hunt TK. Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012 Feb;1(1):3-9.
27. Chen MH, Huang YC, Sun JS, Chao YH. Second messengers mediating the proliferation and collagen synthesis of tenocytes induced by low-level laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2014 Sep 18.
28. Iyama T, Wilson DM, 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013 Aug;12(8):620-36.
29. Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):470-80.

30. Wilson DM, 3rd, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):544-59.
31. Fromme JC, Banerjee A, Verdine GL. DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol*. 2004 Feb;14(1):43-9.
32. Klungland A, Bjelland S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):481-8.
33. Petrusseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae*. 2014 Jan;6(1):23-34.
34. Goosen N. Scanning the DNA for damage by the nucleotide excision repair machinery. *DNA Repair (Amst)*. 2010 May 4;9(5):593-6.
35. Trajano ET, Mencialha AL, Monte-Alto-Costa A, Porto LC, de Souza da Fonseca A. Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser. *Lasers Med Sci*. 2014 Nov;29(6):1953-7.
36. Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003 Nov;85(11):1083-99.
37. Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res*. 2000 Apr;462(2-3):149-58.
38. Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugasawa K, Ohkuma Y, Hanaoka F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIIH to damaged DNA. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9870-5.
39. Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*. 2001 Jul;8(1):213-24.
40. Gillet LC, Scharer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*. 2006 Feb;106(2):253-76.
41. Sun G, Tuner J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent Clin North Am*. 2004 Oct;48(4):1061-76, viii.
42. Seoighe DM, Conroy FJ, Beausang E. The use of lasers in the treatment of cutaneous lesions. *Ir J Med Sci*. 2010 Sep;179(3):321-6.
43. GARCEZ, A.S & NÚÑEZ, C.N. Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Rio de Janeiro, Editora Elsevier. 2012. p. 6:28.
44. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17.

45. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010 Aug;62(8):607-10.
46. Pellicoli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt*. 2014 Feb;19(2):028002.
47. Kilik R, Lakyova L, Sabo J, Kruzliak P, Lacjakova K, Vasilenko T, et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:269253.
48. Dancakova L, Vasilenko T, Kovac I, Jakubcova K, Holly M, Revajova V, et al. Low-level laser therapy with 810 nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2014 Apr;32(4):198-204.
49. Sharifian Z, Bayat M, Alidoust M, Farahani RM, Rezaie F, Bayat H. Histological and gene expression analysis of the effects of pulsed low-level laser therapy on wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):1227-35.
50. Khoo NK, Shokrgozar MA, Kashani IR, Amanzadeh A, Mostafavi E, Sanati H, et al. In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014 Apr;6(2):113-8.
51. Wagner VP, Meurer L, Martins MA, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt*. 2013 Dec;18(12):128002.
52. Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*. 2014 Nov 4.
53. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*. 2004 Apr;22(2):141-50.
54. de Moraes JM, Eterno de Oliveira Mendonca D, Moura VB, Oliveira MA, Afonso CL, Vinaud MC, et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. *Lasers Med Sci*. 2013 Jul;28(4):1169-76.
55. Farahani RM, Kloth LC. The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited. *Int Wound J*. 2008 Jun;5(3):477-82.
56. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013 Feb;28(2):367-74.

57. Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2008 Feb;26(1):47-54.
58. Fiorio FB, Albertini R, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):313-9.
59. Boo S, Dagnino L. Integrins as Modulators of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dermal Fibroblasts During Skin Regeneration After Injury. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013 Jun;2(5):238-46.
60. Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing: a paradigm for regeneration. *Mayo Clin Proc.* 2013 Sep;88(9):1022-31.
61. dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R, Vieira Rde P, Ligeiro AP, et al. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1051-8.
62. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R116.
63. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2009 Dec;175(6):2454-62.
64. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Muller W, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 2010 Apr 1;184(7):3964-77.
65. Jetten N, Roumans N, Gijbels MJ, Romano A, Post MJ, de Winther MP, et al. Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PLoS One.* 2014;9(7):e102994.
66. Tsai WC, Cheng JW, Chen JL, Chen CY, Chang HN, Liao YH, et al. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul;29(4):1377-84.
67. Gupta A, Dai T, Hamblin MR. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):257-65.
68. Ribeiro MA, Albuquerque RL, Jr., Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb;27(1):49-55.
69. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-44.

70. Chiarotto GB, Neves LM, Esquisatto MA, do Amaral ME, dos Santos GM, Mendonca FA. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 Sep;29(5):1685-93.
71. Medrado A, Costa T, Prado T, Reis S, Andrade Z. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010 Aug;26(4):192-7.
72. de Souza da Fonseca A, Mencialha AL, Araujo de Campos VM, Ferreira Machado SC, de Freitas Peregrino AA, Geller M, et al. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. *Lasers Med Sci.* 2013 Jul;28(4):1077-84.
73. da Silva Marciano R, da Silva Sergio LP, Polignano GA, Presta GA, Guimaraes OR, Geller M, et al. Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. *Photochem Photobiol Sci.* 2012 Sep;11(9):1476-83.
74. Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat Res.* 2007 Jan 3;614(1-2):69-76.
75. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* 2008 Feb;34(1):6-17.
76. Goosen N. Scanning the DNA for damage by the nucleotide excision repair machinery. *DNA Repair (Amst).* 2010 May 4;9(5):593-6.
77. Berquist BR, Wilson DM, 3rd. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1-2):61-72.
78. Sugawara K. Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. *Biochemistry (Mosc).* 2011 Jan;76(1):16-23.
79. Brosh RM, Jr. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 Aug;13(8):542-58.
80. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994 Jun;65(6):691-7.
81. Kohli R, Gupta PK, Dube A. Helium-neon laser preirradiation induces protection against UVC radiation in wild-type *E. coli* strain K12AB1157. *Radiat Res.* 2000 Feb;153(2):181-5.
82. Melis JP, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 20;18(18):2409-19.

ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/023/2014 sobre " Efeito do laser terapêutico de baixa potência no processo de reparo tecidual em modelo murino", sob a responsabilidade de **Andréa Monte Alto Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 28/01/2014. Este certificado expira em 28/01/2018.

Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 2014.



Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ



Prof. Dr. Alex C. Manhães
CEUA/IBRAG/UERJ



Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2264-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Artigo publicado

Lasers Med Sci

DOI 10.1007/s10103-014-1612-6

ORIGINAL ARTICLE

Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser

Eduardo Tavares Lima Trajano · Andre Luiz Mencialha ·
 Andréa Monte-Alto-Costa · Luís Cristóvão Pôrto ·
 Adenilson de Souza da Fonseca

Received: 22 January 2014 / Accepted: 5 June 2014
 © Springer-Verlag London 2014

Abstract Although red laser lights lie in the region of non-ionizing radiations in the electromagnetic spectrum, there are doubts whether absorption of these radiations causes lesions in the DNA molecule. Our aim was to investigate the expression of the genes involved with base excision and nucleotide excision repair pathways in skin tissue submitted to burn injury and exposed to low-level red laser. Wistar rats were divided as follows: control group—rats burned and not irradiated, laser group—rats burned and irradiated 1 day after injury for five consecutive days, and later laser group—rats injured and treated 4 days after injury for five consecutive days. Irradiation was performed according to a clinical protocol (20 J/cm², 100 mW, continuous wave emission mode). The animals were sacrificed on day 10, and scarred tissue samples were withdrawn for total RNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis, and evaluation of gene expression by quantitative polymerase chain reaction. Low-level red laser exposure (1) reduces the expression of APE1 messenger (mRNA), (2) increases the expression of OGG1 mRNA, (3) reduces the expression of XPC mRNA, and (4) increases the expression of XPA mRNA both in laser and later laser groups. Red laser exposure at therapeutic fluences alters the expression of genes related to base excision and nucleotide

excision pathways of DNA repair during wound healing of burned skin.

Keywords APE1 · DNA · OGG1 · Laser · XPA · XPC

Introduction

Approximately 11 million people are victims of burns in the world [1] at a cost of 7 billion dollars per year only in the USA [2]. Treatment is generally expensive, lengthy, and painful and affects not only the physical but also the psychological integrity [3].

Low-level laser therapy (LLLT) has been inserted in hospitals and dental and physiotherapy clinics to treat pain, inflammatory diseases, and wound healing [4]. Some clinical protocols are based on the biostimulation effect of LLLT [5]. Novel strategies designed to heal burn wounds with tissue regeneration rather than fibrous scarring would bear tremendous potential for individuals suffering from burn injuries [6]. LLLT has become progressively more popular in the management of a wide variety of medical conditions, including treatment of burn wounds. In laboratory animals, wound healing

ANEXO C – Artigo publicado

Lasers Med Sci
DOI 10.1007/s10103-015-1729-2

ORIGINAL ARTICLE

Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase

Eduardo Tavares Lima Trajano · Larissa Alexsandra da Trajano ·
Marco Aurélio dos Santos Silva · Neil Grant Venter ·
Luís Cristóvão de Porto · Adenilson de Fonseca ·
Andréa Monte-Alto-Costa

Received: 10 December 2014 / Accepted: 18 February 2015
© Springer-Verlag London 2015

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of low-level red laser on tissue repair in rats submitted to second-degree burn, evaluating if the timing of laser treatment influences the healing process. The animals had their backs shaved and divided as follows: control group ($n=12$)—rats burned and not irradiated, early laser group ($n=12$)—rats burned and irradiated from day 1 after injury for five consecutive days, and late laser group ($n=14$)—rats burned and irradiated from day 4 after injury for five consecutive days. Laser irradiation was according to a clinical protocol (20 J/cm^2 , 100 mW, continuous wave emission mode, 660 nm) as recommended by the laser device manufacturer. Half of the animals were sacrificed 10 days after burn, and the other animals were sacrificed 21 days after burn. The late laser group accelerated wound contraction 10 and 21 days after burn. The late laser group accelerated reepithelialization 18 days after burn. The late laser group increases the granulation tissue 10 and 21 days after burn. Both irradiated groups increased type III collagen expression and TGF- β 21 days after burn. Both irradiated groups increased macrophage and myofibroblast num-

bers 10 days after burn and decreased 21 days after. Low-level red laser exposure contributes to the process of tissue repair of second-degree burns, but the intervention during proliferative phase is crucial in the final outcome of the repair process.

Keywords Low-level laser · Burn · Healing

Introduction

According to the International Society of Burns, the burn is defined as an injury to the skin or other body tissue caused mainly by acute thermal trauma such as hot liquid, fire, radiation, electricity, and friction [1]. In the USA, every year, 450,000 patients receive medical treatment related to burns, with over 40,000 hospital admissions and 3500 deaths due to burns [2].

After skin burn injury, the repair process occurs in three overlapping but distinct phases: inflammation, granulation tissue formation, and remodeling [3]. Inflammation is characterized mainly by the recruitment of inflammatory cells, platelet