

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE BRASILEIRA  
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA  
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

**Thaís Abranches Bueno Sabino Bertges**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE E DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CIRÚRGICAS CUTÂNEAS EM RATOS *WISTAR*:  
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PRODUÇÃO *IN SITU*  
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

**Juiz de Fora**

**2015**

**Thaís Abranches Bueno Sabino Bertges**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE E DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CIRÚRGICAS CUTÂNEAS EM RATOS *WISTAR*:  
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PRODUÇÃO *IN SITU*  
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração em Saúde Brasileira.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup**

**Coorientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup**

**Juiz de Fora**

**2015**

**Thaís Abranches Bueno Sabino Bertges**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE E DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CIRÚRGICAS CUTÂNEAS EM RATOS *WISTAR*:  
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PRODUÇÃO *IN SITU*  
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração em Saúde Brasileira.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês da Cruz Campos  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Josemar Parreira Guimarães  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, S ervulo e Wanda, ao meu irm o, Gustavo, e ao meu marido, Klaus, por todo amor, carinho e dedica o em todos esses anos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup pela oportunidade, ensinamentos e paciência durante toda esta jornada.

Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup pela colaboração valiosa na condução deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. Josemar Parreira Guimarães e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês da Cruz Campos, pela disponibilidade e contribuição para o aprimoramento desta dissertação.

À Prof<sup>a</sup>. Karine Helena de Souza Lopes pelo desenvolvimento do modelo experimental.

À Laetitia Cinsa Tuca pela parceria na execução da imuno-histoquímica.

Ao Álvaro César Dutra Presto pelo auxílio na análise histopatológica.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior pela disponibilidade e participação na análise estatística.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Imunopatologia e Imunologia Clínica pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

À FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro no Programa Primeiros Projetos, Processo #: APQ-04368/10.

Mar sonoro, mar sem fundo, mar sem fim.  
A tua beleza aumenta quando estamos sós  
E tão fundo intimamente a tua voz  
Segue o mais secreto bailar do meu sonho.  
Que momentos há em que eu suponho  
Seres um milagre só pra mim.

(Sophia de Mello Breyner Andresen, *Dia do Mar*, 1947)

BERTGES, T. A. B. S. - **Estudo comparativo dos efeitos do laser de baixa intensidade e do ultrassom terapêutico no reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos *Wistar*: avaliação histopatológica e produção *in situ* de mediadores inflamatórios.** Juiz de Fora (MG), 2015. 71 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde – Mestrado em Saúde Brasileira) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora.

## RESUMO

A cicatrização é um evento complexo que tem por objetivo restaurar a integridade anatômica, histológica e funcional de um tecido que sofreu lesão por diferentes etiologias. O potencial de modulação do sistema imunológico e das reações inflamatórias locais, por técnicas não invasivas, é alvo de diversos trabalhos e apesar de tal efeito modulador já ser comprovado clinicamente e corroborado por estudos histomorfológicos, os mecanismos celular e molecular de ação local e sistêmica das principais terapias adjuvantes disponíveis, a laserterapia de baixa intensidade e o ultrassom terapêutico, ainda não estão totalmente esclarecidas. O objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos da terapia a laser de baixa intensidade e do ultrassom terapêutico, isolados e associados no processo de reparo tecidual, de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos *Wistar*, com pesquisa da produção *in situ* de TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e IL-17 por imuno-histoquímica, além de avaliar, por histomorfometria, a deposição de matriz colagenosa na área em cicatrização por estudo retrospectivo em material embocado em parafina (n = 24), cujas amostras foram divididas em: um grupo controle (GI), um submetido apenas à laserterapia (GII), um submetido apenas ao ultrassom (GIII) e um submetido às duas terapias associadas (GIV). Os dados foram expressos em média e desvio padrão, sendo considerado  $p < 0,05$  para indicar resultados estatisticamente significantes. A expressão de TGF- $\beta_1$  foi significativa quando as amostras de GIV foram comparadas com GII e GIII. Em relação a IL-17, as amostras de GI e de GII apresentaram maior porcentagem de células coradas, e a diferença foi significativa entre GII e GIII, e entre GII e GIV.

**Palavras-chave:** Cicatrização. Terapia a laser de baixa intensidade. Ultrassom terapêutico. Ratos *Wistar*. Imunomodulação. Subpopulações de células Th.

BERTGES, T. A. B. S. - **Comparative study of low intensity laser effects and therapeutic ultrasound in tissue repair of cutaneous surgical wounds in *Wistar* rats: histopathology and *in situ* production of inflammatory mediators.** Juiz de Fora (MG), 2015. 71 f. Dissertation (Postgraduate Program in Health – Master's Degree in Brazilian Health) – School of Medicine, Federal University of Juiz de Fora.

## ABSTRACT

Wound healing is a complex event that aims to restore anatomical, histological and functional integrity of a tissue injury suffered by different etiologies. The potential modulation of the immune system and local inflammatory reactions by noninvasive techniques is the subject of several studies and although such modulating effect already being clinically proven and confirmed by histopathologic studies, the cellular and molecular mechanisms of local and systemic actions of main adjuvant therapies available, the low level laser therapy and ultrasonic energy, are still unclear. The aim of this study was to compare the effects of laser therapy of low intensity and the therapeutic ultrasound, isolated and associates in the tissue repair process in surgical wounds in *Wistar* rats, with research in situ production of TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and IL-17 by immunohistochemistry, and to evaluate by histomorphometry, the deposition of collagenous matrix in the area in healing by retrospective study in embocado material paraffin (n = 24), the samples were divided into: a control group (GI) one subject only to laser therapy (GII), a submitted only to the ultrasound (GIII) and submitted to the two associated therapies (GIV). Data were expressed as mean and standard deviation, being considered  $p < 0.05$  to indicate a statistically significant results. The TGF- $\beta_1$  expression was significant when samples of GIV were compared with GII and GIII. With regard to IL-17, samples of GI and GII had a higher percentage of stained cells, and the difference was significant between GII and GIII, and between GII and GIV.

**Keywords:** Wound healing. Low-level laser therapy. Therapeutic ultrasound. *Wistar* rats. Immunomodulation. T-Lymphocyte Subsets.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1 - Fases da cicatrização.....	16
Figura 2 - Ferida cirúrgica no dorso dos animais.....	29
Figura 3 - Aplicação da LLLT.....	31
Figura 4 - Aplicação do UST.....	32

### **Ilustrações do artigo científico**

<b>Figure 1</b> - IL-17 immunohistochemical analysis.....	60
<b>Figure 2</b> - TGF- $\beta_2$ immunohistochemical analysis.....	61
<b>Figure 3</b> - TGF- $\beta_1$ immunohistochemical analysis.....	62
<b>Figure 4</b> - Microscopic analysis.....	63
<b>Graphic 1</b> - Density of inflammatory cells by microscopic field.....	64
<b>Graphic 2</b> - Quantitative measurements of the blood vessels by microscopic field...65	
<b>Graphic 3</b> - Percentage of collagen matrix by ZEN.....	66
<b>Graphic 4</b> - Positive staining of TGF- $\beta_1$ .....	67
<b>Graphic 5</b> - Positive staining of TGF- $\beta_2$ .....	68
<b>Graphic 6</b> - Positive staining of IL-17.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CD45-LCA	- Anticorpo monoclonal anti-CD45 - Antígeno comum leucocitário
BMP	- Proteína morfogenética óssea
CBR	- Centro de Biologia da Reprodução
CEEA	- Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm	- Centímetro(s)
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COL1A1	- Colágeno, Tipo I, alpha 1
COL3A1	- Colágeno, Tipo III, alpha 1
COX	- Ciclo-oxigenase
CXCL8	- Quimiocina CX ligante 8
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	- Óxido nítrico-sintase endotelial
et al.	- E colaboradores
FGF	- Fator de crescimento fibroblástico
g	- Grama(s)
GaAIs	- Arseneto de gálio e alumínio
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H ou h	- Hora(s)
HeNe	- Hélio-neônio
HE	- Hematoxilina-eosina
Hz	- Hertz
IFN	- Interferon
IHQ	- Imuno-histoquímica
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico-sintase induzida
J	- Joule(s)
KCl	- Cloreto de potássio
Kg ou kg	- Quilograma(s)
LLLT	- Terapia com laser de baixa intensidade
LPS	- Lipopolissacarídeo

M	- Molar
mg	- Miligrama(s)
MHz	- Megahertz
mL ou ml	- Mililitro(s)
mm	- Milímetro(s)
MMPs	- Metaloproteinases de matriz
mW	- Megawatt(s)
N ou n	- Número de amostras
nm	- Nanômetro(s)
nNOS	- Óxido nítrico-sintase neuronal
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico-sintase
P ou p	- Nível de significância estatística
PBS	- Tampão fosfato salino
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
ROS	- Espécies reativas ao oxigênio
RT-PCR	- Reverse transcription polymerase chain reaction
T	- Célula ou Linfócito T
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF	- Fator de crescimento transformador
Th	- Célula T helper
TNF	- Fator de necrose tumoral
UFJF	- Universidade Federal de Juiz de Fora
UST	- Ultrassom terapêutico
VEGF	- Fator de crescimento do endotélio vascular
W	- Watts
X ou x	- Vezes, aumento ou magnificação

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\gamma$  - Gama

$^2$  - Elevado ao quadrado

$^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius

® - Marca registrada

$\pm$  - Desvio padrão

= - Igual

< - Menor que

% - Percentual ou por cento

$\mu$  - Micro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Reparo tecidual</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Principais citocinas envolvidas no reparo cutâneo</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3 Técnicas adjuvantes Técnicas adjuvantes envolvidas no reparo cutâneo</b> ..	<b>19</b>
<b>1.3.1 Terapia a laser de baixa intensidade (LLLT)</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.2 Ultrassom terapêutico (UST)</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.3 Associação das técnicas LLLT e UST</b> .....	<b>25</b>
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Animais de experimentação</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 Condições de criação e manejo dos animais</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 Grupos experimentais e procedimento cirúrgico</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4 Tratamentos após a confecção da ferida cutânea cirúrgica</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4.1 Protocolo da laserterapia</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4.2 Protocolo do ultrassom terapêutico</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5 Obtenção das amostras cutâneas</b> .....	<b>32</b>
<b>4.6 Análise histopatológica e histomorfométrica</b> .....	<b>33</b>
<b>4.7 Detecção <i>in situ</i> da expressão de TGF-<math>\beta_1</math>, TGF-<math>\beta_2</math> e IL-17 por IHQ</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8 Análise estatística</b> .....	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>APOIO FINANCEIRO</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b> .....	<b>43</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO AO PERÍODICO BMC</b> .....	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Reparo tecidual

A cicatrização é composta por uma série de eventos complexos e altamente dinâmicos que tem por objetivo fechar a lesão e prevenir a infecção após injúria tecidual (RAJAN; MURRAY, 2008). O reparo pode ser dividido em fases que se sobrepõem no tempo e no espaço (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007), conforme a Figura 1. Esse processo visa eliminar agentes infecciosos, repor células e tecidos lesados, além de restabelecer a barreira da pele. A cicatrização ideal resulta na regeneração do tecido original, com atributos estruturais, funcionais e estéticos similares aos do tecido previamente intacto (RAJAN; MURRAY, 2008).

A primeira fase do processo de reparo é a de hemostasia, dedicada a formar um tampão provisório, logo após a lesão. Com a ativação da cascata de coagulação, plaquetas são ativadas e agregadas pela exposição de colágeno. Posteriormente, são associadas moléculas de fibrina e fibronectina, formando uma matriz provisória que estimula a migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endotéliais (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Ambos, plaquetas e leucócitos, produzem citocinas e fatores de crescimento para ativar o processo inflamatório, a segunda fase da cicatrização. Estão envolvidas nessa fase as citocinas: interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Com a ativação do sistema complemento (em etiologias infecciosas) e degranulação de plaquetas, há o recrutamento de neutrófilos, aproximadamente de dois a cinco dias após a lesão (REINKE; SORG, 2012).

Os neutrófilos são as primeiras células imunes nucleadas a infiltrar uma ferida, agindo como uma primeira linha de defesa na descontaminação do ferimento. Estas células, além de fagocitar material estranho e agentes infecciosos, secretam substâncias, como espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos catiônicos e proteases. Neutrófilos também secretam enzimas que começam o desbridamento do tecido desvitalizado (RAJAN; MURRAY, 2008).

A funcionalidade dos neutrófilos é crucial devido a sua habilidade de fagocitose e secreção enzimática, além de degradar o tecido necrosado. Aproximadamente três dias após a injúria, os macrófagos residentes secretam fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) para promover a proliferação celular e síntese da matriz extracelular, dando início à terceira fase da cicatrização, a de demolição seguida da fase de proliferação e reparo, cerca de dez dias após a injúria (REINKE; SORG, 2012).

Os fibroblastos estão envolvidos em vários processos da cicatrização de feridas, contribuindo para a formação de tecido de granulação, produção de citocinas que favorecem a proliferação e migração dos queratinócitos, e, finalmente, diferenciação em miofibroblastos para promover o fechamento da ferida (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Sob o controle de citocinas, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e TGF- $\beta$ , ocorre a síntese de colágeno, fibronectina e outros componentes proteicos da matriz extracelular. Os fibroblastos e miofibroblastos representam a base celular dessa matriz, fechando lacunas do tecido e restaurando sua resistência (REINKE; SORG, 2012).

Entretanto, a produção exacerbada destes fatores de crescimento, assim como o excesso de mediadores pró-inflamatórios, pode induzir o descontrole da síntese e da degradação tecidual; para reequilibrar o processo ocorrerá a ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e espécies ativas de oxigênio, possibilitando a inativação de citocinas ativas, de acordo com a necessidade de remodelação da matriz. Posteriormente, no processo, destaca-se que a reepitelização também contará com tal interação entre proliferação, síntese e remodelação (SABOL et al., 2012).

A restauração do sistema de vascularização do tecido é um complexo sistema de cascatas de eventos celulares e moleculares para reestabelecer a perfusão de nutrientes para o tecido, através de fatores de crescimento, como o VEGF, o PDGF e o FGF. No processo de revascularização, os fatores de crescimento se ligam aos receptores de células endoteliais preservadas nas bordas da lesão, ativando a cascata de coagulação (RIBEIRO et al., 2009).

A contínua produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (quimiotática para monócitos e macrófagos), aumenta o infiltrado celular no tecido, perpetuando o ciclo de inflamação. Neste estágio, ocorre a produção pelos macrófagos de interleucina 10 (IL-10), um potente anti-inflamatório que reduz a produção macrofágica de outros mediadores pró-inflamatórios. Posteriormente, dá-se início ao remodelamento da matriz e apoptose de leucócitos (KUMAR et al., 2010).

Os fibroblastos começam a infiltrar-se na ferida durante as primeiras etapas de formação de tecido de granulação e estão envolvidos em vários processos de cicatrização de feridas, contribuindo para a formação de tecido de granulação, produzindo as citocinas, e, finalmente, diferenciando-se em miofibroblastos, para promover o encerramento da ferida (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Durante esta fase de remodelação, cessa a formação do tecido de granulação, que passa a amadurecer. No tecido cicatricial maduro, ocorrerá gradualmente a substituição do colágeno Tipo III, em rede, produzido na fase de proliferação, por colágeno mais resistente, do Tipo I, organizado em feixes tridimensionais, diferente do arranjo preexistente na derme. Mais tarde, na mesma fase, ocorre a contração dos miofibroblastos, realizando a junção das bordas da ferida (AARESTRUP, 2012; KUMAR et al., 2010).

Além das células envolvidas no processo de cicatrização, seus produtos influenciam tanto a inflamação, quanto o reparo tecidual.



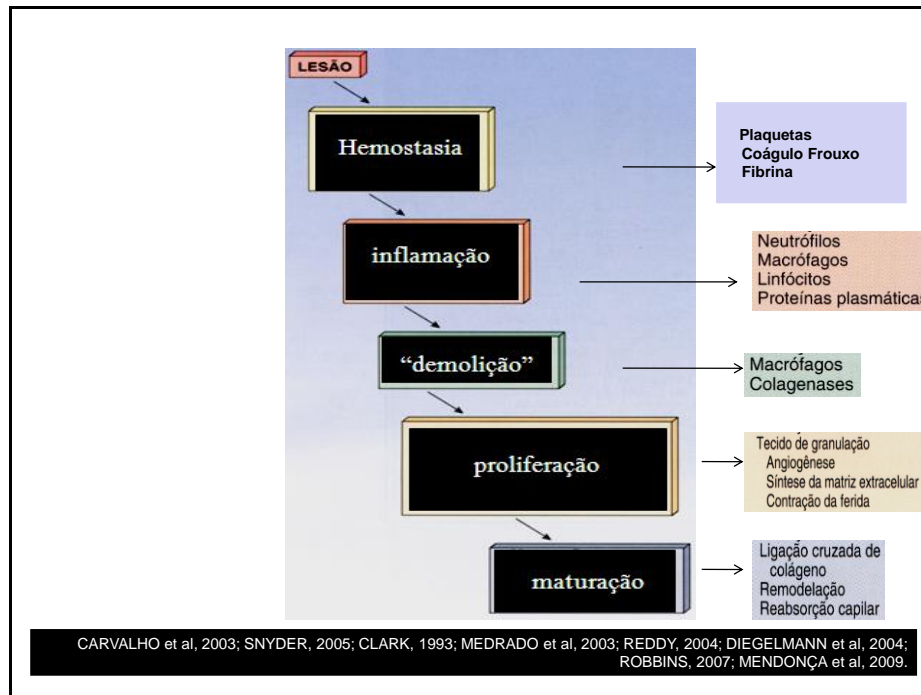


Figura 1 – Fases da cicatrização.

## 1.2 Principais citocinas envolvidas no reparo cutâneo

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico, através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos.

Muitas citocinas inflamatórias têm sido implicadas na cicatrização de feridas. Destaca-se que a molécula produzida por macrófagos que tem sido mais extensivamente estudada por suas ações é o TGF- $\beta$  (FARIA; WEINER, 2006). Liberado por plaquetas em grandes quantidades, imediatamente após a lesão, possui capacidade de induzir a proliferação de neutrófilos e macrófagos durante a fase inflamatória do reparo tecidual (RAGHOW, 1991).

O TGF- $\beta$  possui as isoformas TGF- $\beta_{1,2,3}$  produzidas por plaquetas e células epidérmicas, dentre outras células presentes no sítio de reparo. Todos os membros da família TGF- $\beta$  são secretados acoplados a um "complexo latente" que tem a capacidade de se ligar à matriz extracelular. As formas latentes têm que ser

ativadas através de mecanismos para liberar o TGF maduro, incluindo proteólise por MMPs (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Sabe-se que o aumento da expressão de TGF- $\beta_1$  tem alta relação com a diferenciação de fibroblastos e sua diferenciação para fibrócitos apresentadores de antígenos, com provável ação imunológica durante a reparação de feridas e em respostas fibróticas associadas à inflamação. Tais células são importantes fontes de citocinas e proteínas fibrosas da família dos colágenos, tanto durante o processo inflamatório, quanto na fase reparadora da cicatrização da ferida (BLAKAJ; BUCALA, 2012).

Além do TGF- $\beta$ , o TNF- $\alpha$  é considerado extremamente relevante nos estudos envolvendo inflamação e imunomodulação. Também conhecido como caquexina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos ativados e linfócitos T em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios. O TNF- $\alpha$  regula outras citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas: IL-1, IL-6, interleucina 8 (IL-8) e o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Considerando que as citocinas desempenham papel importante na diferenciação celular, é concebível que o bloqueio de TNF- $\alpha$  possa levar à pancitopenia, mediante inibição da diferenciação dos vários tipos celulares, interrompendo a diferenciação das diversas linhagens celulares, com comprometimento da cicatrização (NISHIMURA, 2009).

Algumas citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , atuando sobre os receptores das células endoteliais, induzem a produção de óxido nítrico (NO), bem como a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos (BALBINO; PEREIRA; CURTI, 2005). Os efeitos celulares relacionados ao ultrassom terapêutico (UST) incluem maior expressão de leucócitos, macrófagos e fibroblastos, produção aumentada de fatores de crescimento, colágeno e NO, além do incremento da angiogênese (ENNIS; LEE; MENESES, 2007).

O metabolismo do NO tem sido amplamente investigado na cicatrização de feridas. O NO é sintetizado por macrófagos e é um importante mediador de reparo tecidual, sendo catalisado pelas sintases de óxido nítrico (NOS). Existem três isoformas de enzimas: óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Como sua forma permanece pouco tempo estável no tecido, a enzima de sua degradação é utilizada como marcador indireto de seus níveis (ALMEIDA et al., 2012).

Destas, destaca-se a iNOS, por diversos anos largamente associada aos eventos patológicos secundários à resposta inflamatória. Sua expressão é estimulada por proteínas bacterianas, entre elas, lipopolissacarídeo (LPS), e citocinas, como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (SALVEMINI, 1997).

As citocinas TGF e TNF também estão associadas ao perfil de citocinas Th1 e Th2, subpopulações já bastante conhecidas de linfócitos TCD4+. Nas últimas décadas, muito se tem pesquisado sobre a interleucina 17 (IL-17) e o seu receptor, IL-17R, descritos inicialmente em meados da década de 1990 (LOUTEN; BONIFACE; MALEFYT, 2009; ROMAGNANI et al., 2009).

Recentemente, linfócitos TCD4+ produtores de IL-17 foram identificados como sendo uma subpopulação com origem distinta dos linfócitos Th1 e Th2, sendo denominados de Th17. Constatou-se que é uma citocina pró-inflamatória produzida por células T e com capacidade de promover a ativação e maturação de neutrófilos. Com avanço nas investigações, concluiu-se que não era única: fazia parte de uma família de citocinas que inclui IL-17A-F, de sequências genéticas diferentes, mas com efeitos semelhantes (ROMAGNANI et al., 2009).

Uma das principais funções da IL-17 é a ativação do endotélio na produção de moléculas quimioatrativas para neutrófilos, além de moléculas de adesão, que possibilitam a diapedese deste leucócito através da parede capilar; esta associação entre IL-17 e endotélio é bastante eficaz, pois as células epiteliais de revestimento vascular expressam receptores para IL-17 e, deste modo, respondem de maneira rápida quando estimuladas por esta citocina. A IL-17, dessa forma, participa ativamente na migração de leucócitos (principalmente de neutrófilos), tanto *in vivo*, quanto em testes *in vitro* (ROUSSEL et al., 2010).

Além da diferenciação, a regulação funcional das células Th17 vem despertando atenção. Neste âmbito, as células Tregs têm sido associadas à supressão das células Th17, pela constatação de que, em humanos, subconjuntos de Tregs podem produzir IL-17, porém, nenhum estudo detalhado das interações entre células Th17 em humanos e IL-17 Tregs foi reportado anteriormente. Além disso, estudos, até o momento, têm sido limitados à análise da capacidade de Tregs em suprimir a produção de IL-17, entretanto, ainda não determinaram se Tregs podem suprimir outras funções efetoras das células Th17 (LOUTEN; BONIFACE; MALEFYT, 2009).

Crome et al. (2013), pela primeira vez, demonstraram que Tregs podem, potencialmente, suprimir a capacidade das células Th17 de proliferação e produção de IL-17, IL-22 e CXCL8. No entanto, a capacidade dessa população de secretar IL-17, claramente não impede a sua capacidade para suprimir a produção de citocina por células Th17. Como a IL-17 pode induzir CXCL8 em vários tipos de células, inclusive células TCD4+ humanas, a expressarem a IL-17R, a supressão de produção de CXCL8 pode ser uma consequência indireta da supressão autócrina de IL-17 (LOUTEN; BONIFACE; MALEFYT, 2009).

### **1.3 Técnicas adjuvantes envolvidas no reparo cutâneo**

Dentre os recursos disponíveis para o auxílio à evolução cicatricial, a utilização de terapias adjuvantes, como a terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) e o ultrassom terapêutico (UST), têm se mostrado de fundamental importância para o estímulo de determinados mecanismos fisiopatológicos, da manutenção da estrutura celular e para melhor qualidade do tecido neoformado (ALTOMARE et al., 2009; FERIL et al., 2008).

#### ***1.3.1 Terapia a laser de baixa intensidade (LLLT)***

Em 1967, Endre Mester, na Hungria, queria testar se o laser poderia causar câncer em ratos. Realizando tricotomia dorsal, tratou a área com laser de rubi de baixa potência (REDDY, 2004). Os animais não desenvolveram câncer, mas, para sua surpresa, o pêlo no grupo tratado voltou a crescer mais rapidamente do que no grupo não tratado. Esta foi a primeira demonstração de "bioestimulação a laser" (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

Quase cinquenta anos depois desta primeira observação, o uso desta técnica passou a fazer parte da realidade clínica, sendo a LLLT um importante recurso adjuvante (SOBANKO; ALSTER, 2008).

A LLLT possui propriedades foto-físicoquímicas, na qual o feixe luminoso interage em nível biomolecular por meio dos processos bioelétricos, bioenergéticos e bioquímicos celulares, promovendo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de aceleração da cicatrização de feridas. Estes efeitos são atribuídos ao estímulo de vários sistemas biológicos, como aumento da proliferação e atividade celular, aumento da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e modulação da produção dos fatores de crescimento e de prostaglandinas (DAMANTE; MARQUES; MICHELI, 2008; PINTO et al., 2009).

A utilização clínica e terapêutica da LLLT é acompanhada de metodologia diversa quando se quer comparar trabalhos já desenvolvidos com a técnica adjuvante. Os comprimentos de onda utilizados em estudos mais recentes variaram entre 632,8 e 904 nm. Por faixa espectral, destacou-se a utilização do comprimento de onda entre 632,8 e 685 nm. A maioria dos estudos produzidos foi *in vivo*, sendo realizados em ratos, em camundongos e em coelhos (PIVA et al., 2011).

Bayat, Azari e Golmohammadi (2009) realizaram estudo para avaliar os efeitos do laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAIs) na cicatrização de feridas cirurgicamente induzidas em ratos, utilizando comprimento de onda de 780 nm, dosagem de 2 J/cm<sup>2</sup> e frequência de 2336 Hz, onde constataram aumento de fibroblastos, vasos sanguíneos e de resistência tênsil, além da diminuição de macrófagos no grupo tratado, comparado ao grupo controle.

Em trabalho de Gonçalves et al. (2007), os resultados evidenciaram que a terapia a laser pode influenciar o processo cicatricial via promoção do aumento da atividade mitótica e da liberação de fatores de crescimento. Ainda, os autores demonstraram maior quantidade de fibroblastos e melhor organização das fibras colágenas no grupo tratado com laserterapia em relação ao grupo controle.

Em estudos anteriores, no mesmo modelo do presente trabalho, foram analisados os efeitos terapêuticos da laserterapia e do ultrassom isolados e associados, em feridas cutâneas de ratos *Wistar*. Rocha Júnior et al. (2007) investigaram a evolução da cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas na região dorsal dos animais (n = 12), tratadas com LLLT, com 3,8 J/cm<sup>2</sup> de dosagem, 15 mW de potência e tempo de aplicação de 15 segundos. Os animais foram divididos em dois grupos, controle e tratado, sendo realizadas no grupo tratado, três aplicações (2 horas após o ato cirúrgico, 48 horas após e 7 dias após a realização das feridas). No décimo dia, os animais foram eutanasiados. Os resultados evidenciaram maior

vascularização e proliferação fibroblástica, com menor quantidade de infiltrado inflamatório nas lesões cirúrgicas submetidas à terapia com laser, quando comparados ao controle. Os resultados sugeriram que a LLLT é um método eficaz no processo de modulação do reparo tecidual, contribuindo para melhor qualidade do tecido neoformado e controle da inflamação.

Ainda em pesquisas desenvolvidas no grupo de pesquisa do CBR/UFJF, foi utilizado o modelo de hipersensibilidade tardia em camundongos *Balb/C* sensibilizados por ovalbumina, através de injeção na região plantar para determinar os efeitos da ação local e sistêmica da LLLT (3,8 J/cm<sup>2</sup>; 10 segundos/dia). A partir deste modelo experimental foram desenvolvidos três trabalhos. Um deles teve como objetivo avaliar o efeito, *in situ*, da aplicação da LLLT sobre a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), por imuno-histoquímica. As amostras provenientes dos animais tratados exibiram redução da espessura cicatricial na região plantar acompanhada por menor expressão de COX-2. Os resultados sugeriram que a laserterapia contribuiu para a redução da expressão deste mediador inflamatório (De OLIVEIRA et al., 2010). O efeito modulador da LLLT também foi observado em um segundo experimento, no qual um dos grupos foi tratado com azatioprina. Foram obtidas amostras teciduais do coxim plantar, as quais foram submetidas à avaliação histopatológica. A análise dos cortes revelou características semelhantes nas amostras provenientes dos grupos tratados com laserterapia e azatioprina: menor espessura tecidual associada a menor volume de edema e menor intensidade de infiltrado inflamatório, em relação ao grupo controle, não tratado (De OLIVEIRA et al., 2010). Em um terceiro experimento, foi realizada cultura de linfócitos obtidos a partir de linfonodos periaórticos de animais de todos os grupos do trabalho. Foram mensurados, na cultura, por meio da técnica *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10. As culturas provenientes dos animais submetidos à laserterapia exibiram níveis significativamente menores destes mediadores, em relação às aquelas tratadas com azatioprina e ao grupo controle. Os resultados, que sugeriram que a LLLT exerceu efeitos imunomodulatórios sistêmicos em cultura de linfócitos, foram os primeiros registrados na literatura (De OLIVEIRA et al., 2010).

Viegas et al. (2007) compararam os efeitos da laserterapia em dois comprimentos de onda (685 e 830 nm) ao uso de meloxicam em feridas cutâneas cirúrgicas no dorso de ratos *Wistar*, em um período de sete dias. Este fármaco tem

conhecido efeito anti-inflamatório. Ainda que os efeitos anti-inflamatórios no grupo tratado com meloxicam tenham sido observados, o estudo confirmou que, ao final do experimento, houve considerável síntese de colágeno nas amostras tratadas com laser, em ambos os comprimentos de onda, em relação ao grupo tratado com o medicamento.

Avaliando os mesmos comprimentos de onda, Szymanska et al. (2013) realizaram um estudo sobre os efeitos da laserterapia em células endoteliais provenientes de veias do cordão umbilical humano. Os resultados apontaram que a laserterapia (comprimentos de onda 635 e 830 nm) estimulou maior proliferação das células endoteliais, associadas à angiogênese e revascularização, e uma concomitante diminuição de VEGF.

Em modelo experimental com 70 ratos *Wistar*, divididos em grupo controle e grupo tratado, utilizaram ferida incisional, longitudinal, dorso-mediana, suturada com pontos simples. No grupo tratado, as feridas foram tratadas diariamente com aparelho de laser de hélio-neônio (HeNe), comprimento de onda de 632,8 nm e energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, durante 12 segundos, em três pontos da lesão. Foi realizada imuno-histoquímica com anti-CD45-LCA para reconhecimento das células inflamatórias e avaliação histoquímica, com coloração Picrosirius, para identificar os colágenos I e III. Os resultados do estudo sugeriram que a LLLT não modificou a qualidade da reação inflamatória, mas diminuiu sua intensidade e aumentou a deposição de colágeno no início do processo cicatricial, não interferindo na maturação da cicatriz (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010).

### **1.3.2 Ultrassom terapêutico (UST)**

O ultrassom é um dispositivo útil para promover a cicatrização de feridas, podendo estimular a angiogênese, regular fatores de crescimento e remover o biofilme das feridas. A frequência de onda pode variar dependendo do tipo de dispositivo de ultrassom, e assim pode ser usado em alta frequência (milhões de Hz) e baixa frequência (milhares de Hz). O ultrassom de baixa frequência pode ser utilizado para penetrar em tecidos profundos e estimular as células, tanto dentro como abaixo do leito da ferida, para promover a cicatrização. O ultrassom de alta

frequência é mais utilizado como dispositivo de diagnóstico (PARK; ALLEN; DRIVER, 2013).

O UST pode ser aplicado por método contínuo (térmico), com objetivo de utilizar o calor como princípio terapêutico ou pulsado (não térmico), quando não se deseja a produção de calor como, por exemplo, em processos inflamatórios (FREITAS et al., 2009). Diversos estudos demonstraram que o efeito não térmico de cavitação (formação de bolhas de vapor e gás em meio líquido resultante da vibração ultrassônica) provoca micromassagem tecidual capaz de alterar a permeabilidade da membrana e estimular a atividade celular (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001; FERIL et al., 2008).

Os efeitos celulares relacionados ao UST incluem maior quimiotaxia de macrófagos e produção aumentada de fatores de crescimento, resultando em maior hiperplasia de fibroblastos e incremento da angiogênese (ENNIS; LEE; MENESES, 2007).

De Bem et al. (2010) avaliaram possíveis alterações histopatológicas e histomorfométricas do tecido sadio *in vivo* de ratos *Wistar* ( $n = 30$ ) tratados com UST de 3 MHz em diferentes intensidades (grupo I:  $0,0 \text{ W/cm}^2$ ; grupo II:  $0,5 \text{ W/cm}^2$ ; grupo III:  $1,0 \text{ W/cm}^2$ ; grupo IV:  $1,5 \text{ W/cm}^2$  e grupo V:  $2,0 \text{ W/cm}^2$ ). O tratamento foi realizado durante quatro dias consecutivos, com duração de dois minutos de irradiação em uma área de  $4 \text{ cm}^2$ , na região dorsal direita dos animais. O lado esquerdo serviu como controle. Observaram um discreto infiltrado inflamatório abaixo da epiderme e alteração das fibras colágenas, tornando-as mais delgadas e numerosas, principalmente nos grupos tratados com  $1,5$  e  $2,0 \text{ W/cm}^2$ . Notaram também, um aumento na espessura da epiderme nas amostras dos animais tratados, com diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com  $1,0$ ,  $1,5$  e  $2,0 \text{ W/cm}^2$ .

Os efeitos do UST pulsátil sobre a cicatrização cutânea em ratos *Wistar* ( $n = 20$ ) foram investigados por Freitas et al. (2009), após realização de feridas cirúrgicas. Esses ratos foram divididos em quatro grupos e submetidos a diferentes doses de UST: grupo I – controle, sem tratamento; grupo II –  $0,4 \text{ W/cm}^2$ ; grupo III –  $0,6 \text{ W/cm}^2$  e grupo IV –  $0,8 \text{ W/cm}^2$ . O tratamento foi iniciado imediatamente após o procedimento cirúrgico e se sucedeu por dez dias consecutivos. A frequência do equipamento utilizado foi de 1 MHz e o tratamento era realizado por 3 minutos. Ao final do décimo dia, os animais foram eutanasiados e biópsias foram coletadas para



verificação do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), relacionadas com o índice de lipoperoxidação e hidroxiprolina (índice de síntese de colágeno). Foi evidenciada diminuição de TBARS em todos os grupos, sugerindo aceleração da fase inflamatória e aumento de hidroxiprolina nos grupos III e IV, o que pode estar relacionado à maior síntese de colágeno.

Os efeitos do UST sobre a expressão de TGF- $\beta$  têm sido recentemente estudados por diversos autores (GURKAN et al., 2010; XU et al., 2009).

Fu et al. (2010) investigaram, *in vivo*, os efeitos da aplicação do UST sobre a síntese de matriz extracelular colágena, em áreas cicatriciais, em feridas cirúrgicas no tendão patelar em ratos. Analisaram amostras obtidas após quatro, 14 e 28 dias de tratamento; foi analisada a expressão de decorina e biglicano (proteoglicano e proteína que estabilizam o feixe de colágeno), COL1A1 e COL3A1 (genes expressos por fibroblastos metabolicamente ativos da derme) e TGF- $\beta$  por RT-PCR. Foi observada maior expressão dos genes COL1A1 e COL3A1 na fase inicial do reparo e menor expressão de decorina e biglicano na fase tardia; a expressão de TGF- $\beta$  não foi alterada significativamente na evolução do processo nos grupos estudados. Concluíram que a aplicação de UST foi capaz de estimular a síntese de colágeno apenas nas fases iniciais de formação do tecido de granulação, não afetando o modelamento do tecido conjuntivo nas fases mais tardias do processo de reparo, independente da expressão do TGF- $\beta$ .

Em estudo *in vitro*, Xu et al. (2009) investigaram os efeitos da associação entre o quimioterápico trióxido de arsênio e o tratamento com UST sobre a ativação de macrófagos, em cultura de células de neurogliocitoma. Os resultados demonstraram que a aplicação do ultrassom potencializava a necrose tecidual e a apoptose celular através do aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , secretados por macrófagos.

Recentemente, Guimarães et al. (2011) realizaram um experimento de comparação entre o uso do UST e de dexpanthenol 10%, isolados e associados. Esse fármaco também conhecido como pró-vitamina B5, em contato com a pele, reduz a perda transepidermica da água, evitando o seu ressecamento e a sua descamação. Devido a sua ação higroscópica mantém a água fundamental da pele e repõe o manto hidrolipídico, auxiliando na sua renovação natural. Atua também como um agente hidratante. Demonstraram efeitos benéficos do UST associados ao aumento da birrefringência dos colágenos em amostras de tecido dos grupos

tratados, principalmente naquele com associação dos tratamentos, o que reflete em colágeno bem estruturado e maduro, com a aceleração da síntese de matriz extracelular na área cicatricial, melhorando o reparo nos estágios precoces do processo.

### **1.3.3 Associação das técnicas LLLT e UST**

O possível efeito cumulativo da associação entre a LLLT e o UST foi investigado por Demir et al. (2004). Compararam os efeitos destas terapias, isoladas e associadas, sobre a cicatrização de lesões em tendão de ratos, através da análise bioquímica dos níveis de hidroxiprolina, aminoácido estrutural fundamental para a organização dos feixes colágenos. As amostras teciduais foram submetidas à avaliação bioquímica no quarto, décimo e 21º dia após o início do tratamento. Os resultados demonstraram que, a partir do décimo dia, os níveis de hidroxiprolina aumentaram consideravelmente em todos os grupos tratados em relação ao controle, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados, assim como entre todos os grupos precocemente, no quarto dia.

Apesar de bastante discutida e empregada clinicamente, há na literatura poucos estudos que analisaram os efeitos biológicos da associação entre as técnicas de LLLT e UST, especialmente em feridas de tecidos moles, o que motivou o presente estudo.

Este estudo procurou elucidar a influência das terapias laser e ultrassom, isolados e associados, no perfil de citocinas e deposição de colágeno, na cicatrização cutânea de feridas cirúrgicas em ratos *Wistar*, possibilitando melhor compreensão do mecanismo biológico das mesmas.

## **2 HIPÓTESE**

A associação das terapias adjuvantes não invasivas, LLLT e UST, modula a resposta inflamatória de modo mais favorável em relação ao uso das mesmas isoladamente, quando aplicadas em feridas cutâneas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Comparar os efeitos da LLLT e do UST, isolados e associados, no processo de reparo tecidual de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*).

#### 3.2 Específicos

- Determinar e comparar a quantidade de células inflamatórias nas amostras provenientes de feridas cutâneas de ratos *Wistar*, submetidas à LLLT e ao UST, isolados e associados;
- Determinar e comparar a angiogênese nas amostras provenientes de feridas cutâneas de ratos *Wistar*, submetidas à LLLT e ao UST, isolados e associados;
- Quantificar, por histomorfometria automática, a deposição de matriz extracelular colagenosa em amostras provenientes de feridas cutâneas cirúrgicas de ratos *Wistar*, submetidas à LLLT e ao UST, isolados e associados;
- Verificar, utilizando o método de imuno-histoquímica, a produção *in situ* dos mediadores inflamatórios TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e IL-17 em amostras de feridas cutâneas cirúrgicas de ratos *Wistar*, submetidas à LLLT e ao UST, isolados e associados;
- Comparar os dados obtidos com amostras correspondentes provenientes de animais não tratados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto experimental foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado em 02 de fevereiro de 2010, sob o número 034/2010 (Anexo A).

### 4.1 Animais de experimentação

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) (n = 24), machos, com idade entre seis e oito semanas e variação de peso entre 160 e 220 g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

### 4.2 Condições de criação e manejo dos animais

O desenvolvimento do modelo experimental foi conduzido no próprio biotério.

O alojamento do biotério é provido de iluminação mista - luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6 horas e apagarem às 18 horas. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas, em gaiolas individuais, providas de camas de maravalha selecionada, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada.

Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

### 4.3 Grupos experimentais e procedimento cirúrgico

A região dorsal dos animais foi tricotomizada após anestesia com ketamine (100 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg). Após a assepsia do local com álcool iodado 2%, foi realizada marcação da região por meio de *punch* cirúrgico, com diâmetro de 20 mm. Com auxílio de um material cirúrgico esterilizado, a região foi pinçada e o fragmento de tecido cutâneo foi removido com tesoura (Figura 2).



Figura 2 – Ferida cirúrgica no dorso dos animais.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam analgesia com butorfanol (2 mg/kg), administrado via subcutânea e passaram por repouso pós-operatório de 2 horas, ou seja, eles ficaram em gaiolas individuais e não foram submetidos à intervenção neste período.

Posteriormente à confecção das feridas, os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Grupo I – controle (n = 6);
- Grupo II – submetido ao tratamento com laserterapia (n = 6);
- Grupo III – submetido ao tratamento com ultrassom (n = 6);
- Grupo IV – submetido à laserterapia e ultrassom associados (n = 6).

Os animais do grupo controle foram submetidos aos procedimentos mecânicos de tratamento com laserterapia e ultrassom com aparelhos desligados.

#### **4.4 Tratamentos após a confecção da ferida cutânea cirúrgica**

As aplicações do laser, isoladas ou associadas, foram realizadas 2 horas após o ato cirúrgico, a segunda aplicação 48 horas após o procedimento e uma última aplicação sete dias após a confecção da lesão.

O UST foi realizado a cada dois dias, sendo a primeira aplicação 2 horas após a lesão cirúrgica e a última no nono dia do tratamento. Quando a aplicação foi realizada no grupo de técnicas associadas, o ultrassom foi realizado logo após a aplicação da LLLT, uma vez que o gel utilizado para acoplar o transdutor ultrassônico é à base de água, o que poderia interferir na absorção do laser.

Os protocolos propostos foram estabelecidos na literatura, assim como fizeram parte da metodologia de pesquisas desenvolvidas no núcleo do CBR/UFJF (CORRÊA; AARESTRUP; AARESTRUP, 2010; De OLIVEIRA et al., 2010; ROCHA JÚNIOR et al., 2007, 2009).

##### **4.4.1 Protocolo da laserterapia**

Foi utilizada LLLT da marca MMOPTICS, modelo Twin Laser, com emissão infravermelha, pulsátil, comprimento de onda de 780 nm, potência de pico de 70 mW (potência média de saída entre 0,5 a 3,5 mW) e aplicação através de fibra ótica. A aplicação do feixe foi em “varredura” na área central da ferida, permitindo irradiação uniforme da ferida cirúrgica cutânea (Figura 3).

Os animais dos grupos II e IV tiveram as feridas submetidas à LLLT nos seguintes parâmetros: 15 mW de potência, dose de 3,8 J/cm<sup>2</sup>, 15 segundos de aplicação.



Figura 3 – Aplicação da LLLT.

#### **4.4.2 Protocolo do ultrassom terapêutico**

Foi utilizado o UST da marca IBRAMED, modelo Sonopulse Compact, com os seguintes parâmetros: modo pulsado, frequência de 1 MHz, intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup> e duração de 3 minutos de aplicação, sendo utilizado gel à base de água como meio de condução. O cabeçote do aparelho foi mantido sobre a lesão onde foram realizados movimentos circulares leves, sem compressão nas mesmas (Figura 4).





Figura 4 – Aplicação do UST.

#### 4.5 Obtenção das amostras cutâneas

Um dia depois da última aplicação, no décimo dia, após anestesia com xylazine (100 mg/kg) e ketamine (10 mg/kg) (TERUYA et al., 2008), os animais foram então submetidos à eutanásia com KCl.

Foram obtidas, por remoção excisional, as áreas correspondentes à localização da ferida cirúrgica, abrangendo a pele adjacente às bordas da ferida e todo o tecido cicatricial em profundidade.

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% imediatamente após obtenção e submetidas ao processamento histológico de rotina.

O material embocado em parafina foi submetido à microtomia com cortes de 4 a 5  $\mu$ m de espessura. Após a confecção da lâmina, cortes correspondentes a cada amostra foram separados para realização de coloração de rotina em HE e para realização de reação imuno-histoquímica.

O estudo foi desenvolvido a partir de material proveniente de arquivo, resultante de experimento de uma das linhas de pesquisa do Núcleo de Pesquisa em Imunopatologia e Imunologia Clínica, da qual este estudo fez parte.

#### 4.6 Análise histopatológica e histomorfométrica

Para realização da histomorfometria, foram obtidos cortes das amostras emblocadas e os mesmos submetidos à técnica clássica da hematoxilina e eosina (HE), conforme descrito:

Após a hidratação dos cortes, os mesmos foram corados durante 15 minutos pela hematoxilina de Harris: 5 g de hematoxilina dissolvidos em 50 ml de álcool absoluto e 100 g de alúmen de amônio ou potássio em 1000 ml de água destilada aquecida; as duas soluções foram misturadas, fervidas, em seguida adicionaram 2,5 g de óxido de mercúrio, reaquecido até tornar-se púrpuro escuro; retiraram do aquecimento e esfriaram rapidamente. Foram adicionados 2 a 4 ml de ácido acético glacial por 100 ml de solução, filtrado antes do uso e o material foi lavado e azulado em água corrente por 5 minutos e água amoniacal (200 ml de água destilada com 3 gotas de hidróxido de amônio), corados pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciados em etanol a 70%.

Os cortes foram então analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 250X, 400X e 1000X, em toda sua extensão. A análise foi realizada por dois observadores com experiência e formação em histopatologia, juntamente com a mestrandia. A partir desta avaliação, foram selecionadas, em aumento de 400X, cinco áreas em cada amostra para captura digital por sistema computadorizado AxioVision® (Zeiss, Berlim, Alemanha), através de câmera digital acoplada a microscópio óptico. As imagens capturadas foram processadas em programa de histomorfometria automático ZEN® (Versão 2012 para Windows), aprovado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH, Bethesda, EUA). Através da histomorfometria foi realizada a quantificação de área de deposição de matriz extracelular colagenosa nas áreas da ferida cirúrgica em cicatrização por método automático. As contagens obtidas nos cinco campos em cada amostra foram somadas, submetidas à média aritmética e o resultado foi expresso em porcentagem, em relação à área total de captura.

#### 4.7 Detecção *in situ* da expressão de TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ e IL-17 por IHQ

O método de imuno-histoquímica (IHQ) para detecção da expressão de TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e IL-17 envolveu as etapas: a) fixação em acetona (10 minutos); b) reidratação dos cortes em PBS, pH 7.4 (10 minutos); c) bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 0,4% (30 minutos); d) lavagem em PBS (10 minutos); e) incubação com soro normal de cavalo em câmara úmida (20 minutos); f) incubação com cada anticorpo primário, sendo anti-TGF- $\beta_1$ : TGF beta (V): sc-146; (Santa Cruz, INC), diluição 1:100; anti-TGF- $\beta_2$ : TGF beta (V): sc-90; (Santa Cruz, INC), diluição 1:100 e anti-IL-17: IL-17 (H-132): sc-7927; (Santa Cruz, INC), diluição 1:100 (1 hora); g) lavagem em PBS (10 minutos); h) incubação com anticorpo secundário de cabra biotilado anti-IgG, diluição 1:100 em PBS (30 minutos); i) lavagem em PBS (30 minutos); j) incubação com tampão acetato 0,2 M, pH 5.2 (10 minutos); k) revelação do produto da reação imunológica empregando a solução de 3-amino-9-eticarbazol (1 a 3 minutos); l) lavagem em água corrente (10 minutos); m) contracoloração com hematoxilina de Harris (1 minuto); n) lavagem em água corrente (10 minutos); o) montagem da lâmina com Elvanol (polivinilálcool) e lamínula.

O controle da reação imuno-histoquímica foi realizado omitindo-se, em alguns cortes, a etapa de incubação com o anticorpo primário (WU et al., 2010).

A positividade foi determinada pela observação, em microscopia óptica, de coloração castanha intracitoplasmática.

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica foram analisados por dois observadores com experiência e formação em histopatologia e, a partir da avaliação de toda a extensão dos cortes, foram selecionados cinco campos (400X, microscópio óptico Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) para captura digital (AxionVision, Zeiss, Berlim, Alemanha).

A partir das contagens obtidas em cada amostra, o resultado foi expresso por média aritmética simples.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

A análise estatística foi realizada pelo programa software GraphPad Prism 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

O teste ANOVA foi utilizado, sendo considerado  $p < 0,05$  para indicar resultados estatisticamente significantes.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram apresentados na forma de artigo (Apêndice A).

## 6 CONCLUSÃO

A LLLT aplicada isoladamente é capaz de modular positivamente a expressão de TGF- $\beta_2$  no tecido cicatricial cutâneo de ratos *Wistar*, favorecendo a evolução do processo, enquanto a produção de IL-17 apresenta-se reduzida no grupo tratado com as duas terapias associadas, diminuindo o processo inflamatório.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. V. **Histologia essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALMEIDA, R. M. et al. Evaluation of the S-methylisothiurea hemisulfate, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, on the healing of volonic anastomosis in rats. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 27, n. 12, p. 892-896, Dec. 2012.
- ALTOMARE, M. et al. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. **Wound Repair Regen**, St. Louis, v. 17, n. 6, p. 825-831, Nov./Dec. 2009.
- BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Phys Ther**, Albany, v. 81, n. 7, p. 1351-1358, July 2001.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Cienc Farm**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 114-128, Jan./Mar. 2005.
- BAYAT, M.; AZARI, A.; GOLMOHAMMADI, M. G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 28, n. 4, p. 465-470, Aug. 2009.
- BLAKAJ, A.; BUCALA, R. Fibrocytes in health and disease. **Fibrogenesis Tissue Repair**, London, v. 5, n. 1, p. 6, June 2012.
- BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 14, n. 1, p. 45-51, Jan./Feb. 2010.
- CORRÊA, J. O.; AARESTRUP, B. J.; AARESTRUP, F. M. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Exp Neurol**, New York, v. 226, n. 1, p. 15-23, Nov. 2010.
- CROME, S. Q. et al. Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. **J Immunol**, Baltimore, v. 185, n. 6, p. 3199-3208, Sep. 2010.
- DAMANTE, C. A.; MARQUES, M. M.; De MICHELI, G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura. **Rev Fac Odontol**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 88-93, Oct./Dec. 2008.
- De BEM, D. M. et al. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (*in vivo*) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 14, n. 2, p. 114-120, Mar./Apr. 2010.

DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Laser Surg Med**, New York, v. 35, n. 1, p. 84-89, Jan. 2004.

De OLIVEIRA, R. G. et al. Low-level laser therapy reduces delayed hypersensitivity reaction to ovalbumin in Balb/C mice. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 28, n. 6, p. 773-777, Dec. 2010.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, Tampa, v. 9, n. 1, p. 283-289, Jan. 2004.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 127, n. 3, p. 514–525, Mar. 2007.

ENNIS, W. J.; LEE, C.; MENESES, P. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. **J Clin Dermatol**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 63-72, Jan-Feb. 2007.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. **Inflamm Allergy Drug Targets**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. 179-190, Sep. 2006.

FERIL, L. B. Jr. et al. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. **J Med Ultrasonics**, Tokyo, v. 35, n. 4, p. 153-160, July/Aug. 2008.

FREITAS, T. P. et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 161, n. 1, p.168-171, June 2009.

FU, S. C. et al. In vivo low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) following tendon injury promotes repair during granulation but suppresses decorin and biglycan expression during remodeling. **J Orthop Sports Phys Ther**, Washington, v. 40, n. 7, p. 422-429, July 2010.

GONÇALVES, W. L. et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 877-884, June 2007.

GUIMARÃES, G. N. et al. Effect of ultrasound and dexpanthenol on collagen organization in tegumentary lesions. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 15, n. 3, p. 227-232, May/June 2011.

GURKAN, I. et al. Modification of osteoarthritis in the guinea pig with pulsed low-intensity ultrasound treatment. **Osteoarthr Cartil**, London, v. 18, n. 5, p. 724-733, May 2010.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low-level light therapy. **Proc SPIE**, San Jose, v. 6140, n. 1, p. 1-12, Feb. 2006.



KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran – Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LOUTEN, J.; BONIFACE, K.; MALEFYT, R. W. Development and function of Th17 cells in health and disease. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 123, n. 5, p. 1004-1011, May 2009.

NISHIMURA, S. L. Integrin-mediated transforming growth factor-activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 175, n. 4, p. 1362-1370, Oct. 2009.

PARK, N. J.; ALLEN, L.; DRIVER, V. R. Updating on understanding and managing chronic wound. **Dermatol Ther**, Hoboken, v. 26, n. 3, p. 236-256, May/June 2013.

PINTO, N. C. et al. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: therapeutic proposal. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 88-91, Jan/Mar. 2009.

PIVA, J. A. A. C. et al. Effect of low-level therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 5, p. 947-954, Sep/Oct. 2011.

RAGHOW, R. Role of transforming growth factor- $\beta$  in repair and fibrosis. **Chest**, Chicago, v. 99, n. 3, p. 61-65, Mar. 1991.

RAJAN, V.; MURRAY, R. Z. The duplicitous nature of inflammation in wound repair. **Wounds. Wound Prac Res**, Perth, v. 16, n. 3, p. 122-129, Aug. 2008.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-150, Apr. 2004.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, Basel, v. 49, n. 1, p. 35-43, Jan. 2012.

RIBEIRO, M. A. G. et al. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm<sup>2</sup>  $\lambda$  660-nm laser irradiation. **Indian J Dent Res**, Mumbai, v. 20, n. 3, p. 390, Oct. 2009.

ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **J Vasc Bras**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 258-266, Sep. 2007.

ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 27, n. 2, p. 303-307, Apr. 2009.

RODERO, P. R.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int J Clin Exp Pathol**, Madison, v. 3, n. 7, p. 643-653, July 2010.

ROMAGNANI, S. et al. Properties and origin of human Th17 cells. **Mol Immunol**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 3-7, Nov. 2009.

ROUSSEL, L. et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. **J Immunol**, Baltimore, v. 18, n. 8, p. 4531-4537, Apr. 2010.

SABOL, F. et al. Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. **Vet Med**, Prague, v. 57, n. 2, p. 77-82, Feb. 2012.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci**, Basel, v. 53, n. 7, p. 756-582, July. 1997.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. **Dermatol Surg**, New York, v. 34, n. 8, p. 991-1000, Aug. 2008.

SZYMANSKA, J. et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. **J Physiol Pharmacol**, Krakow, v. 64, n. 3, p. 387-391, June. 2013.

TERUYA, R. et al. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 29-35, Jan./Feb. 2008.

VIEGAS, V. N. et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 25, n. 6, p. 467-473, Dec. 2007.

WU, X. et al. The evolutionary rate variation among genes of HOG-signaling pathway in yeast genomes. **Biol Direct**, London, v. 10, n. 5, p. 2-10, July. 2010.

XU, Y. et al. The effects of ultrasound and arsenic trioxide on neurogliocytoma cells and secondary activation of macrophages. **Tumori**, Milan, v. 95, n. 6, p. 780-788, Nov./Dec. 2009.

## **APOIO FINANCEIRO**

O projeto recebeu apoio financeiro da FAPEMIG através do Programa Primeiros Projetos, Processo #: APQ-04368/10.

**ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão de Ética na Experimentação Animal

**CERTIFICADO –**

Certificamos que o Protocolo nº 034/2009 – CEEA sobre “Estudo comparativo dos efeitos do Laserterapia de Baixa Intensidade e do Ultra-som Terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas de ratos: estudo Histomorfométrico”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Adeir Moreira Rocha Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/02/2010.

**C E R T I F I C A T E**

We certify that the protocol nº 034/2009 - CEEA about “Estudo comparativo dos efeitos do Laserterapia de Baixa Intensidade e do Ultra-som Terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas de ratos: estudo Histomorfométrico” – Adeir Moreira Rocha Junior- is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/02/2010.

Juiz de Fora, 02 de Fevereiro de 2010

  
Presidente CEEA

  
PI Secretário CEEA

## APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO AO PERÍODICO BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE

### BMC Complementary and Alternative Medicine

#### EFFECTS OF LOW LEVEL LASER AND THERAPEUTIC ULTRASOUND ON TISSUE REPAIR IN WISTAR RATS: HISTOPATHOLOGICAL STUDY AND TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 AND IL-17 EXPRESSION

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	EFFECTS OF LOW LEVEL LASER AND THERAPEUTIC ULTRASOUND ON TISSUE REPAIR IN WISTAR RATS: HISTOPATHOLOGICAL STUDY AND TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 AND IL-17 EXPRESSION
Article Type:	Research article
Section/Category:	Basic Research
Funding Information:	
Abstract:	<p><b>ABSTRACT</b></p> <p>Objective: The objective was to compare the effects of LLLT and TUS, alone and in combination, on the granulation tissue and on TGF-<math>\beta</math>1, TGF-<math>\beta</math>2 and IL-17 expression during the tissue repair process of surgical skin wounds in Wistar rats. Methods: The effects of laser therapy and therapeutic ultrasound on surgical skin wounds in Wistar rats were evaluated. On the tenth day, at the moment of euthanasia, the wound be excised, and processed for histopathological evaluation to assess the density and organization of collagen fibers. In addition, histomorphometric evaluations were conducted to quantify angiogenesis and inflammatory infiltrates, and immunohistochemistry was performed to assess TGF- <math>\beta</math>1, TGF-<math>\beta</math>2 and IL-17 expression. We used GraphPad Prism and Kruskal-Wallis e Dunn's tests. The results are expressed as the average <math>\pm</math> standard deviation. Values of <math>p &lt; 0.05</math> were considered statistically significant. Results: It was observed that in all experimental groups was greater TGF-<math>\beta</math>1 expression in comparison to TGF-<math>\beta</math>2, however, isolated LLLT potentiated a TGF-<math>\beta</math>2 expression compared to untreated samples and other treatments. It suggest that possibly the TGF-<math>\beta</math>2 expression is stimulated by LLLT isolated and such expression is one of immunomodulatory factors cellularity of the infiltration, the stimulus to fibroplasia and angiogenesis in the repair process. In IL-17 immunohistochemistry, the G1 and GII showed a higher percentage of stained cells, and the difference was significant between GII and GIII and GII and GIV, suggesting that the two therapies associated promote a fall in the expression of this cytokine. Conclusions: The results suggest that the immunomodulatory effects on IL-17 and TGF-<math>\beta</math>2 expression are associated with the synergistic effects of LLLT and TUS.</p>
Corresponding Author:	THAÍS abranches bueno sabino BERTGES Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora Suprema Juiz de Fora, MG BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora Suprema
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	THAÍS abranches bueno sabino BERTGES
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	THAÍS abranches bueno sabino BERTGES Álvaro César Dutra Presto Karine Helena de Souza Lopes Fernando Monteiro Aarestrup Beatriz Julião Vieira Aarestrup
Order of Authors Secondary Information:	

**EFFECTS OF LOW LEVEL LASER AND THERAPEUTIC ULTRASOUND ON  
TISSUE REPAIR IN WISTAR RATS: HISTOPATHOLOGICAL STUDY AND TGF-  
 $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  AND IL-17 EXPRESSION**

THAÍS ABRANCHES BUENO SABINO BERTGES\*

ÁLVARO CÉSAR DUTRA PRESTO\*\*

KARINE HELENA DE SOUZA LOPES\*\*\*

FERNANDO MONTEIRO AARESTRUP\*\*\*\*

BEATRIZ JULIÃO VIEIRA AARESTRUP\*\*\*\*\*

\* Dermatologist. Postgraduate Student in Health, Federal University of Juiz de Fora. Professor, School of Medical Sciences and Health of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil. thaisabsbertges@hotmail.com.

\*\* Academic. Course of Biological Sciences. Intern at the Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology/CBR, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil. alvarodutrap@gmail.com.

\*\*\* Physical Therapist. Master Degree in Health, Federal University of Juiz de Fora. Professor, School of Medical Sciences and Health of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil. karineslopes@yahoo.com.br.

\*\*\*\* MD. PhD Pathology. Researcher of Immunopathology and Experimental Pathology Laboratory/CBR, Federal University of Juiz de Fora. Professor, Federal University of Juiz de Fora. Professor, School of Medical Sciences and Health of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil. fmaarestrup@hotmail.com.

\*\*\*\*\* DDS. PhD. Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology/CBR, Federal University of Juiz de Fora. Department of Morphology Institute of Biological

Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil.

beatrizaarestrup@gmail.com

Correspondence author: Beatriz Julião Vieira Aarestrup, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução. Rua José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, Bairro Martelos. beatrizaarestrup@gmail.com.

**Authorship Standards:** Each person listed as an author has participated in the study to a significant extent. The authors accept full responsibility for the design and conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.

## **ABSTRACT**

**Objective:** The objective was to compare the effects of LLLT and TUS, alone and in combination, on the granulation tissue and on TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and IL-17 expression during the tissue repair process of surgical skin wounds in Wistar rats. **Methods:** The effects of laser therapy and therapeutic ultrasound on surgical skin wounds in Wistar rats were evaluated. On the tenth day, at the moment of euthanasia, the wound was excised, and processed for histopathological evaluation to assess the density and organization of collagen fibers. In addition, histomorphometric evaluations were conducted to quantify angiogenesis and inflammatory infiltrates, and immunohistochemistry was performed to assess TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and IL-17 expression. We used GraphPad Prism and ANOVA test. The results are expressed as the average  $\pm$  standard deviation. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. **Results:** It was observed that in all experimental groups there was greater TGF $\beta_1$  expression in comparison to TGF- $\beta_2$ , however, isolated LLLT potentiated a

TGF- $\beta_2$  expression compared to untreated samples and other treatments. It suggests that possibly the TGF- $\beta_2$  expression is stimulated by LLLT isolated and such expression is one of immunomodulatory factors cellularity of the infiltration, the stimulus to fibroplasia and angiogenesis in the repair process. In IL-17 immunohistochemistry, the GI and GII showed a higher percentage of stained cells, and the difference was significant between GII and GIII and GII and GIV, suggesting that the two therapies associated promote a fall in the expression of this cytokine. Conclusions: The results suggest that the immunomodulatory effects on IL-17 and TGF- $\beta_2$  expression are associated with the synergistic effects of LLLT and TUS.

## **INTRODUCTION**

Adjuvant therapies such as low level laser therapy (LLLT) and therapeutic ultrasound (TUS) have been demonstrated to be options for the modulation of physiopathological mechanisms that result in an enhanced quality of the newly formed tissue and a shorter total time of healing. The low level laser has photo and physicochemical properties in which the laser light acts at a biomolecular level, promoting anti-inflammatory and analgesic effects and accelerating wound healing. Several studies suggest that these effects occur through an increase in cell proliferation and metabolism associated with increased DNA synthesis, growth factor synthesis and reduced prostaglandin production.<sup>[1]</sup>

In addition to LLLT, TUS is an auxiliary resource for enhancing the healing process. Its effects include the stimulation of chemotaxis, increased fibroblast and endothelial proliferation and increased synthesis of growth factors and collagen.<sup>[2]</sup>

In all of these phenomena, the effect of the treatment is based on increased cell membrane permeability.<sup>[3]</sup> The effect of TUS on collagen synthesis and



immunomodulation was studied by Tsai *et al.* in tendon lesions, by Li *et al.* in osteoblast cultures and by Maeshige *et al.* in fibroblast cultures.<sup>[4,5,6]</sup> These studies and others suggest that the described effects are mediated by the expression of different transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) isoforms.<sup>[1]</sup>

The TGF- $\beta$  superfamily includes the TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and TGF- $\beta_3$  isoforms; BMP (bone morphogenetic proteins); activins; and inhibins.<sup>[7,8,9]</sup> TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$  were demonstrated to be immunosuppressive cytokines by Kobie *et al.* and Gomez and Kruse, in addition to their different roles in the healing process.<sup>[7,8]</sup>

TGF- $\beta_2$ , which has been extensively studied, influences mononuclear leukocyte differentiation, stimulates fibroblast proliferation and inhibits extracellular matrix degradation proteases.<sup>[10,11]</sup>

TGF- $\beta_1$  upregulates protease and integrin transcription; stimulates collagen synthesis in the matrix; stimulates myofibroblast differentiation, which leads to the contraction of lesion edges; and stimulates angiogenesis.<sup>[12]</sup> Amendt *et al.* suggest that TGF- $\beta_1$  expression is associated with the increased proliferation and decreased apoptosis of keratinocytes.<sup>[13]</sup> It is interesting to note that the serum levels of TGF- $\beta_1$  are lower in diabetic patients who have venous ulcers.<sup>[14]</sup>

IL-17 plays protective roles in host defense against certain pathogens at epithelial and mucosal barriers. This cytokine is important for the clearance of the extracellular bacteria. At an early stage of infection (day 7), IL-17a and IL-17f are equally important in controlling the bacterial burden, whereas at later stages (days 14 and 21), IL-17f is more critical, and IL-17a becomes less important, despite still being functional. IL-17a also contributes to pro-inflammatory cytokine and chemokine production.<sup>[15]</sup> Furthermore, it was observed that in the presence of TGF- $\beta$ , cells "naive" Treg lymphocytes differentiate into whereas in the presence of TGF- $\beta$  and IL-

6, the same precursor cells originate Th17 cells, by modifying the pattern of immune response and consequently, the progress of the repair process.<sup>[16]</sup>

Considering the use of TUS in the clinical setting to enhance pressure ulcer healing and the healing of other wounds such as tendon and bone lesions and the use of LLLT to accelerate the closure of skin and mucous membrane ulcers, it is important to understand the immunological events and histopathological factors involved with skin repair.<sup>[6,14]</sup> In addition, it is important to understand the mechanisms of action of auxiliary therapies on the inflammatory process to support the establishment of treatment protocols for modulating the healing process, reducing repair time and improving scar tissue quality.

The objective of this study was to compare the effects of LLLT and TUS, alone and in combination, on the granulation tissue and TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and IL-17 expression during the tissue repair process of surgical skin wounds in Wistar rats. To date, studies have not been published showing the effect of the combination of these techniques as assessed in this study.

## **METHODS**

All animal procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA), Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF (Protocol # 034/2009).

### **Rat wound models**

Before the surgical wounds were made, the animals were first anesthetized using an intraperitoneal application of ketamine 100 mg/kg + xylazine 10 mg/kg. Next, a trichotomy was performed on the dorsolateral region of all the animals and local asepsis was performed using 2% alcoholic iodine. One elliptic wound with 1 x 2 cm

were made in the dorsolateral region of the animals. The wound were previously outlined by pencil copy marker using a sterilized paper model. The surgical incision in the skin was done using a scapel removing the tissue until the dorsomuscular fascia. The Wistar rats ( $n = 24$ , male *Rattus norvegicus*, aged seven weeks, average weight of 200 g) were subsequently divided into groups: GI ( $n = 6$ ), control, subjected to contact with turned-off devices (sham); GII ( $n = 6$ ), subjected to LLLT; GIII ( $n = 6$ ), treated with US; and GIV ( $n = 6$ ), treated simultaneously with LLLT and TUS.

### **Laser therapy protocol**

The first LLLT application, isolated or combined with TUS, was performed 2 hours after the surgery. The second application was performed 48 hours after the procedure, and the last was performed seven days after the lesion. TUS was applied every two days. The first application was 2 hours after the surgical lesion, and the last application was given on the ninth day of treatment. In group IV, TUS was performed after the LLLT application so that it would not interfere with laser absorption. The device used for LLLT was the MMOPTICS (São Carlos/SP, Brazil), model Twin Laser, which was equipped with an infrared emission laser and used with pulsatile signals, 780 nm wavelength, 70 mW peak power (average output power between 0.5 and 3.5 mW) and application through fiber-optic sweeping at the central area of the wound, 15 mW power, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose and 15 s of application.

### **Therapeutic ultrasound application protocol**

The device used for TUS treatment was an IBRAMED (Amparo/SP, Brazil), Sonopulse Compact model, which was used in pulsed mode with a 1 MHz frequency, 0.4 W/cm<sup>2</sup> intensity and 3 min of application. Water-based gel was used as the conductive agent.

### **Collection of skin samples**

One day after the last day of treatment, the animals were euthanized by anesthetic overdose (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg).

The surgical wound was excised, including the adjacent skin and the deep scar tissue. The samples were fixed in buffered formalin at 10% and subjected to routine histological processing, embedded in paraffin blocks and sectioned on a microtome (5 µm sections). After they were prepared, sections corresponding to each sample were selected for routine staining in hematoxylin and eosin and for immunohistochemical processing.

### **Histopathological, histomorphometric and immunohistochemical analysis**

The slides were thoroughly analyzed with a Zeiss microscope (Hallbergmoos, Germany) by two different observers with experience and training in histopathology to evaluate the density and organization of collagenous fibers and the general characteristics of the other granulation tissue components.

Histomorphometry (Axiovision<sup>®</sup>, Version 4.5 for Windows) was performed as follows to quantify the inflammatory cells blood vessels and collagen fibers. Five fields (400x) per sample were selected for digital capture (Axion Vision computerized system, Zeiss, Berlin, Germany). The result is expressed as the simple arithmetic mean calculated from the counts obtained for each sample.

Samples were observed throughout its length in an optical microscope Zeiss (Hallbergmoos, Germany) by two independent appraisers, with training and experience in histopathology. After observation, field representative of the dermis were selected in the corresponding area will wound healing for descriptive histopathological analysis (400X) and 4 fields to capture digital still (400X) for

automatic morphometry of collagenous extracellular matrix (Zen program pro 2012 Zeiss (Hallbergmoos, Germany).

The immunohistochemical method used to detect TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  and IL-17 expression involved the following steps: deparaffinization for 20 min (60°C) and immersion in three xylol baths for 3 min each; hydration in alcohol (100%, 95% and 70%) for 3 min each; blocking of the endogenous peroxidase (0.4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min; 100  $\mu$ L per slide); antigen retrieval in a 95°C water bath for 40 min, in PBS; and cooling for 20 min at room temperature and rinsing with PBS for 1 min. This step was followed by the addition of four drops of Background Sniper to the slide and 15 min incubation (room temperature). The slides were then rinsed in PBS buffer (1 min), and the prepared slides were incubated with the primary antibody anti-TGF- $\beta_1$ : TGF beta (V): sc-146; Santa Cruz, INC.) (Dilution 1:100  $\mu$ L) for 1 hour, anti-TGF- $\beta_2$ : TGF beta (V): sc-90; Santa Cruz, INC.) (Dilution 1:100  $\mu$ L) and anti-IL-17: IL-17 (H-132): sc-7927; Santa Cruz, INC.) (Dilution 1:100  $\mu$ L). The slides were subsequently rinsed twice in PBS (2 min) and then incubated with a drop of the secondary antibody (Link Universal Trekkie) for 20 min (room temperature). The slides were rinsed twice in PBS (2 min), incubated in a humid chamber for 10 min with TrekAvidin-HRP (Label) - streptavidin (room temperature) and then rinsed twice in PBS (2 min each). The slides were then incubated with one drop of Betazoid DAB Chromogen (DAB) homogenized in 1 ml of PBS (5 min). They were then rinsed twice in distilled water and in PBS and then counterstained with hematoxylin (1 min). Finally, the slides were rinsed in distilled water and then twice in PBS (1 min each) and dehydrated in three alcohol baths 100% (1 min each) followed by three xylol baths (1 min each). The slides were then prepared. The negative control was produced by omitting the

primary antibody in a selected slide. Positive results were defined by the presence of brown cytoplasmic staining visible under a light microscope.

Two different observers with experience and training in histopathology analyzed the slides subjected to immunohistochemistry. Five fields (400x, Zeiss light microscope, Hallbergmoss, Germany) were selected for digital capture (Axion Vision, Zeiss, Berlin, Germany) after the evaluation of the entire slide. The results are expressed as the simple arithmetic mean calculated from the counts obtained in each sample. (Figures 1, 2 and 3).

### **Statistical analysis**

We used GraphPad Prism (version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA), and ANOVA test. The results are expressed as the average  $\pm$  standard deviation. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Histopathological, histomorphometric and immunohistochemical analyses**

Microscopic analysis of slides prepared for HE staining:

GI (Control): Intense inflammatory infiltrate, crust associated with hemorrhage (4A).

Area of edema and fibrinous inflammation area (4B). Discreet deposition of extracellular materials (4C).

GII (LLLTT): Group with variable characteristics with some samples showing still hemorrhagic crust associated with inflammation fibrinous and discreet infiltrate (4D).

Other samples exhibiting slightly more numerous vascularization (4E) and deposition bulkier and organized collagen, associated with the large amount of cells with morphology suggestive of fibroblasts (4F).

GIII (TUS): Vessels with endothelium still maturing, developing thinner wall and less organized with respect to GIV (4G). Presence of hemorrhagic and inflammatory infiltrate crust with predominance of neutrophils (4H). Deposition of slightly more dense collagen fibers, however, disorganized. Numerous capillaries were observed in samples (4I).

GIV (LLLT + TUS): In panoramic samples (4J), there is still presence of thick crust, quite evident angiogenesis with numerous thin-walled vessels with a standard proliferation perpendicular to the lesion surface (4K). Extracellular matrix with mixed inflammatory infiltrate, recent fibroblasts, collagen deposition in unorganized discrete fibers (4L).

The density of the inflammatory infiltrate was lower in the samples from GII (LLLT) and GIII (TUS) than in the samples from GI (control) ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences between the samples from GIV (LLLT + TUS) compared to the other groups ( $p < 0.05$ ) (Graphic 1).

The amount of blood vessels per microscopic field was significantly higher in GIV (LLLT + TUS) compared to the other groups ( $p < 0.05$ ) (Graphic 2).

The percentage of collagen matrix for the GI field was 8.5913; 11.6467 in GII; 9.0274 in GIII and GIV: 12.8008. The percentage of collagen increased in all treated groups, with significant differences in GIV compared to the control group (GI). (Graphic 3).

The TGF- $\beta_1$  expression in the connective tissue from the GIV samples (LLLT + TUS) ( $p < 0.05$ ) was not statistically significant from that of the samples from GI (control). However, a significant difference was observed when the GIV samples (LLLT + TUS) was compared with GII (LLLT) and GIII (TUS) ( $p < 0.05$ ) (Graphic 4).

It was observed that in all experimental groups, including the control, was greater TGF- $\beta_1$  expression in comparison to TGF- $\beta_2$ , as shown in Graphic 4; however,

isolated LLLT potentiated a TGF- $\beta_2$  expression compared to untreated samples and other treatments. The results suggest that possibly the TGF- $\beta_2$  expression is stimulated by LLLT isolated and such expression is one of immunomodulatory factors cellularity of the infiltration, the stimulus to fibroplasia and angiogenesis in the repair process (Graphic 5).

In IL-17 immunohistochemistry, the GI and GII showed a higher percentage of stained cells, and the difference was significant between GII and GIII and GII and GIV, suggesting that the two therapies associated promote a fall in the expression of this cytokine (Graphic 6).

## **DISCUSSION**

A previous study by our laboratory in which we utilized a model of surgical skin wounds in Wistar rats treated with LLLT (780 nm, 70 mW peak power; average output power between 0.5 and 3.5 mW, 15 mW power, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose, 15 s of application) found a correlation between the increased number of fibroblasts and a higher apoptosis rate of epithelial cells in the skin coating when evaluated using the TUNEL method in comparison to untreated samples, and this correlation was associated with higher TGF- $\beta_2$  expression in connective tissue cells.<sup>17</sup> These results suggest that LLLT induces epithelial apoptosis during repair because it increases cell proliferation, proportionally increases keratinocyte turnover and has an immunomodulatory effect associated with the expression of TGF- $\beta_2$ .

More recently, we have also demonstrated the potential immunosuppressive role of laser therapy (15 mW, 3.8 J/cm<sup>2</sup> dose, 10 s per day) in a model of late hypersensitivity induced by ovalbumin in Balb/C mice. The results suggested that the immunomodulatory activity of LLLT was similar to that of azathioprine, a classic



immunosuppressive drug used in transplant patients.<sup>18</sup> In the present study, the local immunomodulatory action of LLLT was not enhanced when the technique was combined with TUS. A lower quantity of inflammatory infiltrate was observed in the samples treated with LLLT or TUS. The results suggest that combining the techniques did not enhance the inhibition of the anti-inflammatory effects that were observed when they are used individually.

Although several *in vitro* and *in vivo* studies have discussed the use of LLLT and TUS both alone and in combination, the mechanisms of action of these auxiliary therapies on the repair process and on the inflammatory components have not been completely clarified.

As described in literature,<sup>[6,14]</sup> the repair is a process whose phases overlap. As observed macroscopically, the wounds of groups I, II and III were erythematous in the ninth day after surgery, while in GIV lesions were less erythematous despite the greater amount of vascular sections per microscopic field. Still, it is observed in the microscopic analysis of the samples of GIV a greater maturity of extracellular material with collagen fibers more dense and organized. These results suggest that although the LLLT and TUS are associated with less inflammatory infiltrates, the application of therapies associated contribute to better local vascularization and to a better maturation of collagenous extracellular matrix.

TGF- $\beta_1$  is another isoform of this cytokine that has been studied to try to identify the mechanism of action of LLLT. Ferrari et al. found that TGF-  $\beta_1$  expression is concomitantly associated with angiogenesis and the induction of apoptosis in endothelial cells. Using an experimental model of skin wounds in a hybrid transgenic mouse lineage (lineage 25).<sup>[19]</sup> Shah et al. noted that following the inhibition of serum TGF- $\beta_1$ , there was a lower inflammatory response, higher deposition of extracellular

matrix and decrease of late healing in skin wounds.<sup>[20]</sup> However, the increase in the expression of the same factor led to a lower deposition of matrix with no changes in the overall healing process.

In this study, despite lower leukocyte counts being found in samples treated with LLLT and TUS, individually, those populations had a larger number of TGF- $\beta_1$ -positive cells; that is the increase in the inflammatory infiltrate observed when techniques were combined was not caused by cells expressing this cytokine.

Wood *et al.* demonstrated in an experimental model of traumatic lesions in rat tendons that samples treated with LLLT (GaAlAs, 830 nm, 40 mW, 1.4 W/cm<sup>2</sup>, 0.12 J), with TUS (3 MHz, pulsatile, 1.0 W/cm<sup>2</sup>) and with both techniques combined presented a higher level of type-I collagen synthesis compared to the untreated control group.<sup>[21]</sup> Qualitatively, although the samples treated with TUS alone had more organized fibers compared to the others, there was no significant difference between the treated groups. Similar results were previously noted by Demir *et al.*, whose experiment showed that type-I collagen deposition in traumatic lesions induced in rat tendons was higher in samples treated with LLLT, TUS or LLLT combined with TUS in comparison to the untreated group but that there were no significant differences between the techniques when used individually or together.<sup>[22]</sup>

In the present study, the treatment of the wounds with the combined techniques enhanced the vascularization of granulation tissue. These data suggest that although LLLT is associated with lower inflammatory cell density, the angiogenic stimulation induced by TUS increased the inflammatory infiltrate in the scar tissue area when the techniques were combined.

Rodero *et al.* demonstrated that in situ administration of Il-17a induces the progression of the healing process in C57BL/6 mice genetically ob/ob. <sup>[23]</sup>

In a study healing of oral wounds in 10 diabetic rats with autosomal recessive mutation on chromosome 4, showing similarities to the human type 2 diabetes, subjected to extraction rights molars with dental explorer, it was noted in the tissues of these animals, a higher sensitivity to TGF- $\beta$ , as it is found in lower values when compared to TGF- $\beta_2$  and TGF- $\beta_3$ , promoting less migration of epithelial tissue to the wound area.<sup>[24]</sup>

Many studies show the therapeutic potential of effective LLLT with anti-inflammatory and healing activity.

In this study, we observed the therapeutic action of the techniques and found that the association (LLLT + TUS) is beneficial to the healing process and reduced inflammation.

Mechanisms of action of LLLT have been much studied, however, there are gaps in knowledge that need to be completed understand about the mechanism in its entirety. In addition, the TUS's mechanism of action has also been an object of study and is not yet fully defined. We note that the TUS has the potential angiogenic and this certainly is part of the mechanism that explains the faster the healing process. However, increased angiogenesis not necessarily occur with increased inflammatory activity, which was reduced with the combination of LLLT. The evaluation of the expression in situ immunohistochemistry of TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$  and IL-17 provided important information that helped us understand the mechanism of action of the interaction of the two therapies, leading to decreased inflammation and increased production collagen.

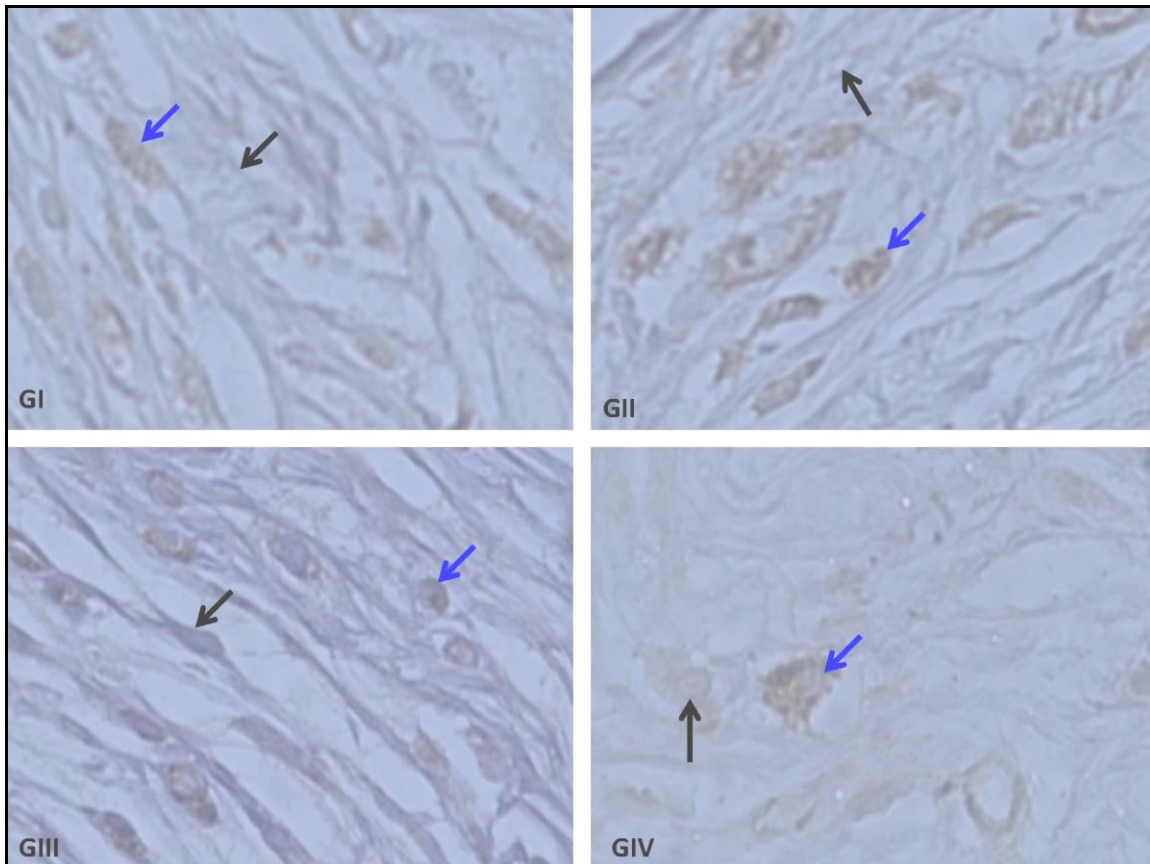
The expression of TGF- $\beta_1$  was not statistically significant when comparing the different experimental groups. The expression of TGF- $\beta_2$  showed an increase with LLLT administration, but it was also no significant difference when compared to the

control group. Regarding IL-17 expression, potentially pro inflammatory, we observed a marked reduction in cytokine expression in situ, when using the TUS and the association of this technique with LLLT.

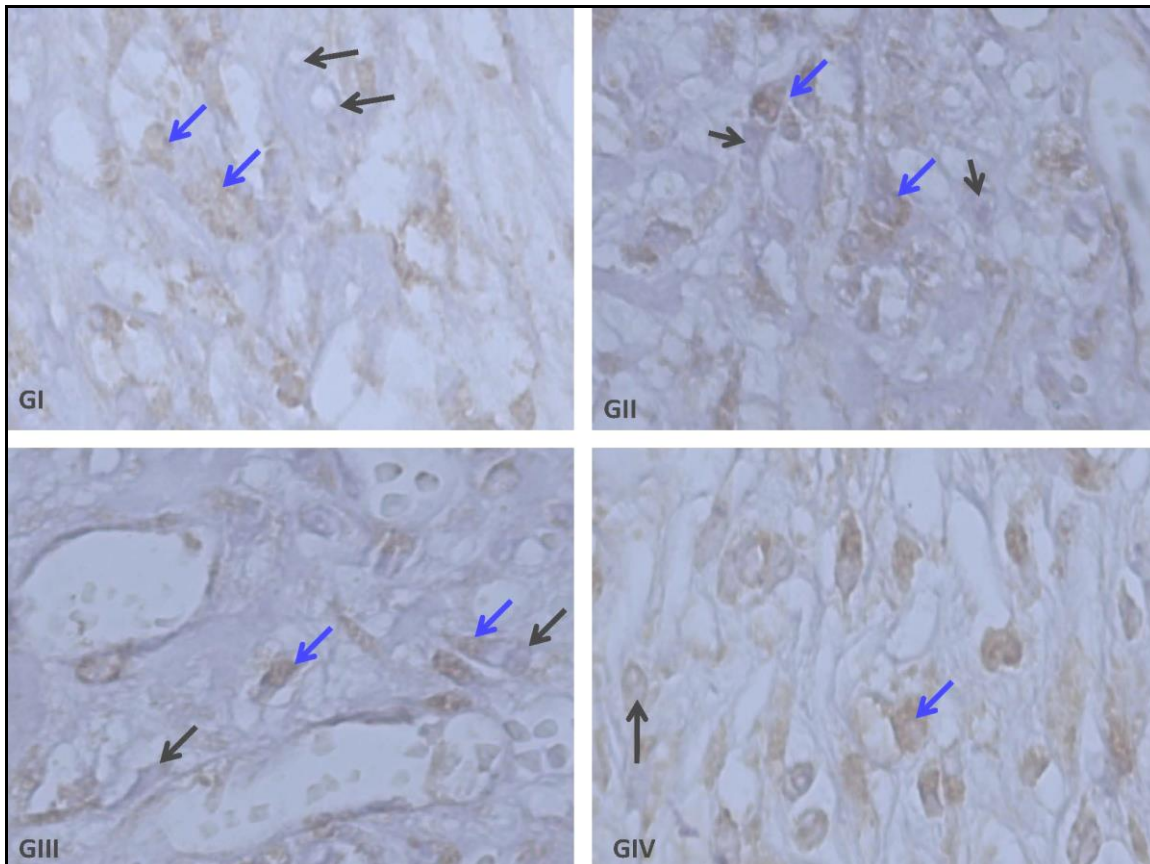
Thus, the results together suggest that induction of the angiogenic process concomitantly with a decrease in IL-17 expression may explain, at least partially, the synergistic effects of the combination therapies of both promoting wound healing and reducing the local inflammatory activity.

### **Conclusions**

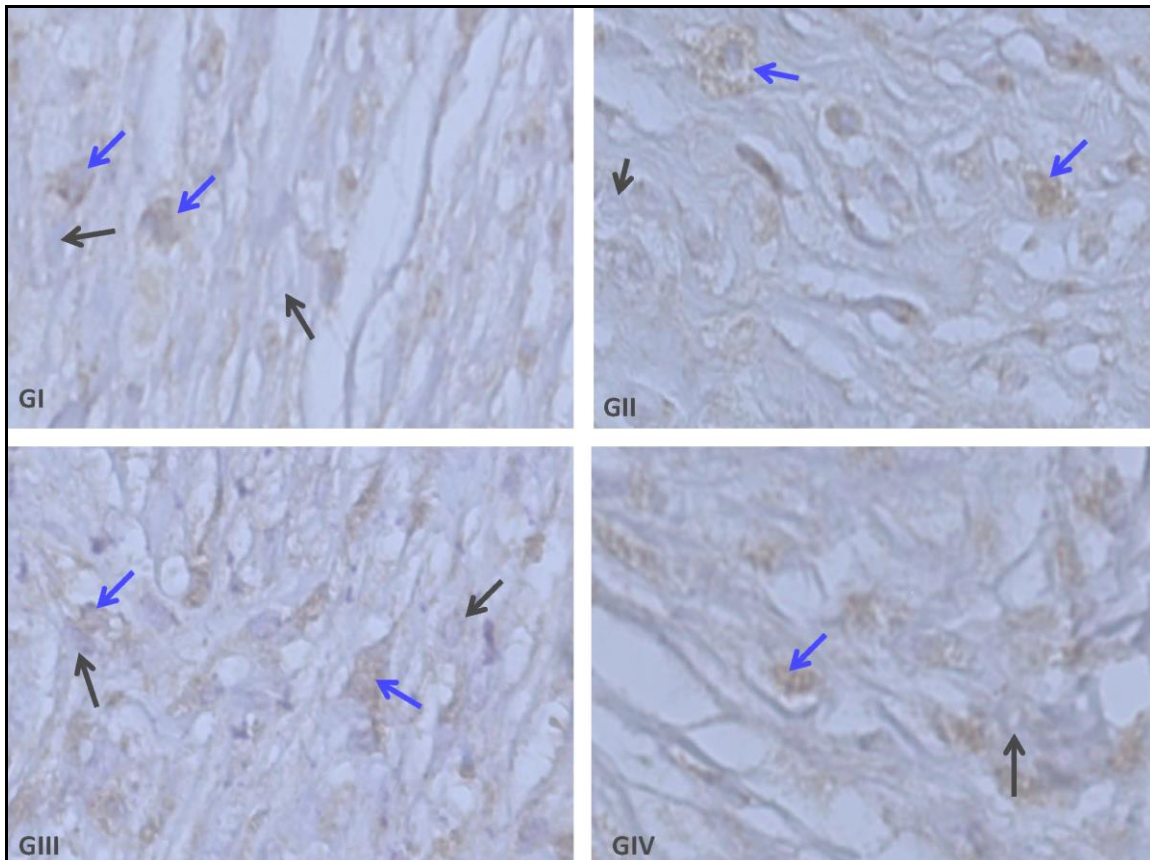
The LLLT applied alone is able to positively modulate the TGF- $\beta_2$  expression in cutaneous scar tissue of Wistar rats, favor the evolution of the process, while IL-17 production has to be decreased in the groups treated with both associated therapies.



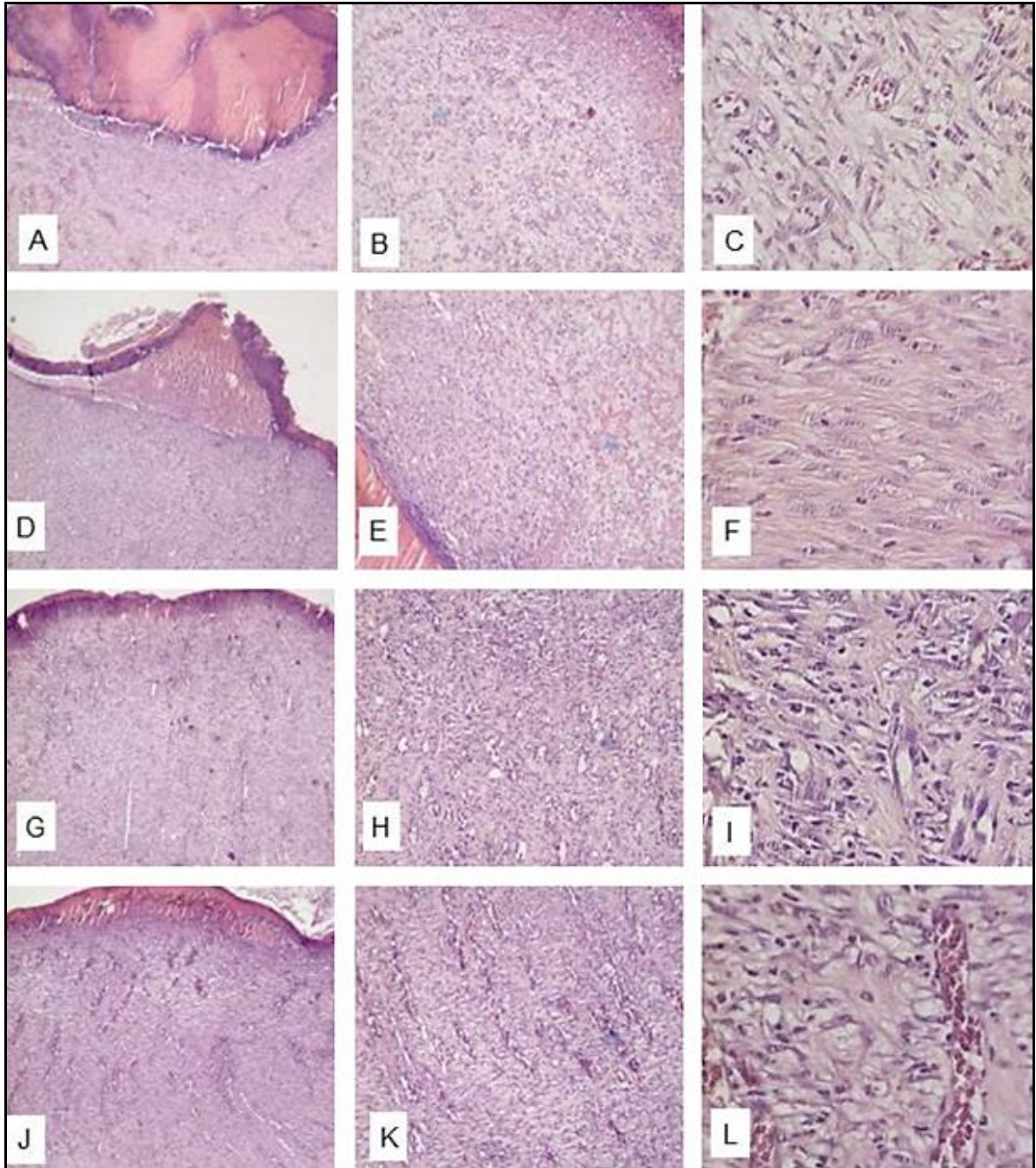
**Figure 1** - IL-17 immunohistochemical analysis: positives staining cells indicated as blue arrows and negative staining cells indicated as black arrows.



**Figure 2** - TGF- $\beta_2$  immunohistochemical analysis: positives staining cells indicated as blue arrows and negative staining cells indicated as black arrows.

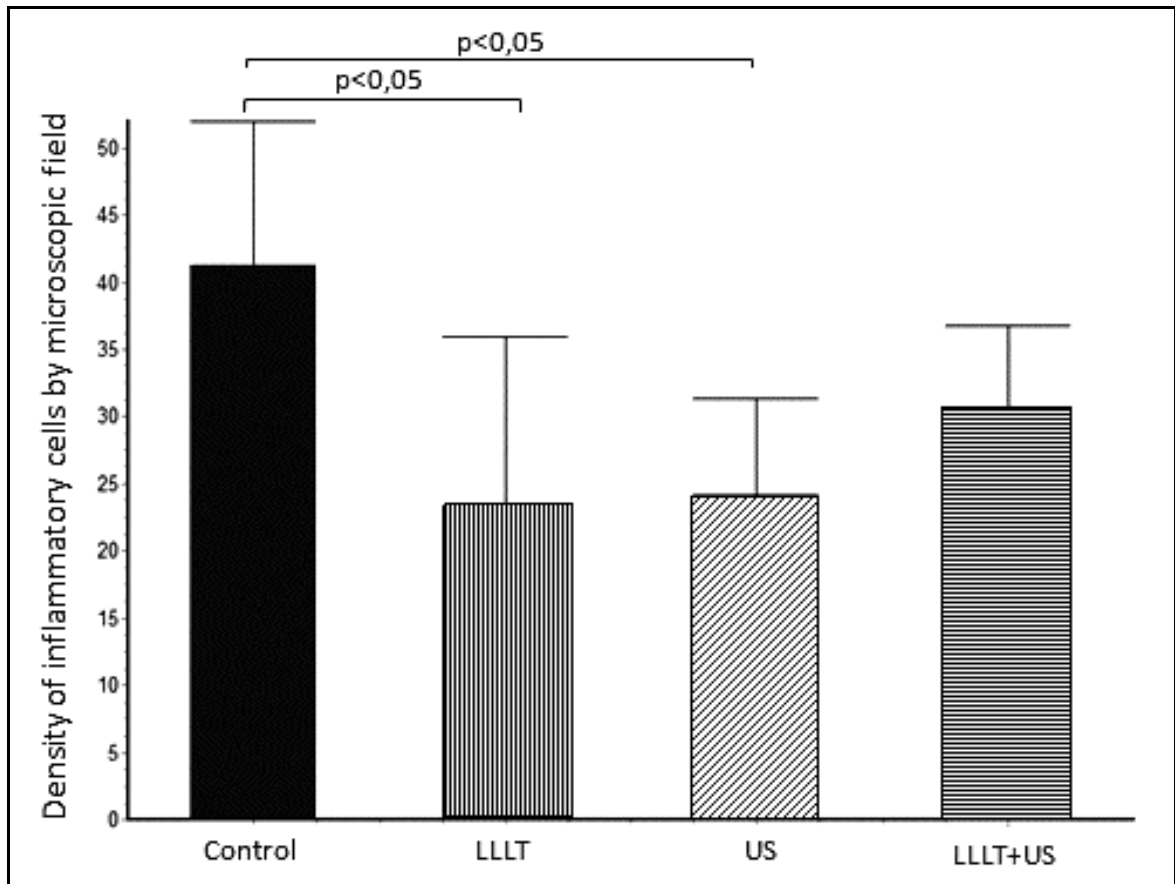


**Figure 3** - TGF- $\beta_1$  immunohistochemical analysis: positives staining cells indicated as blue arrows and negative staining cells indicated as black arrows.

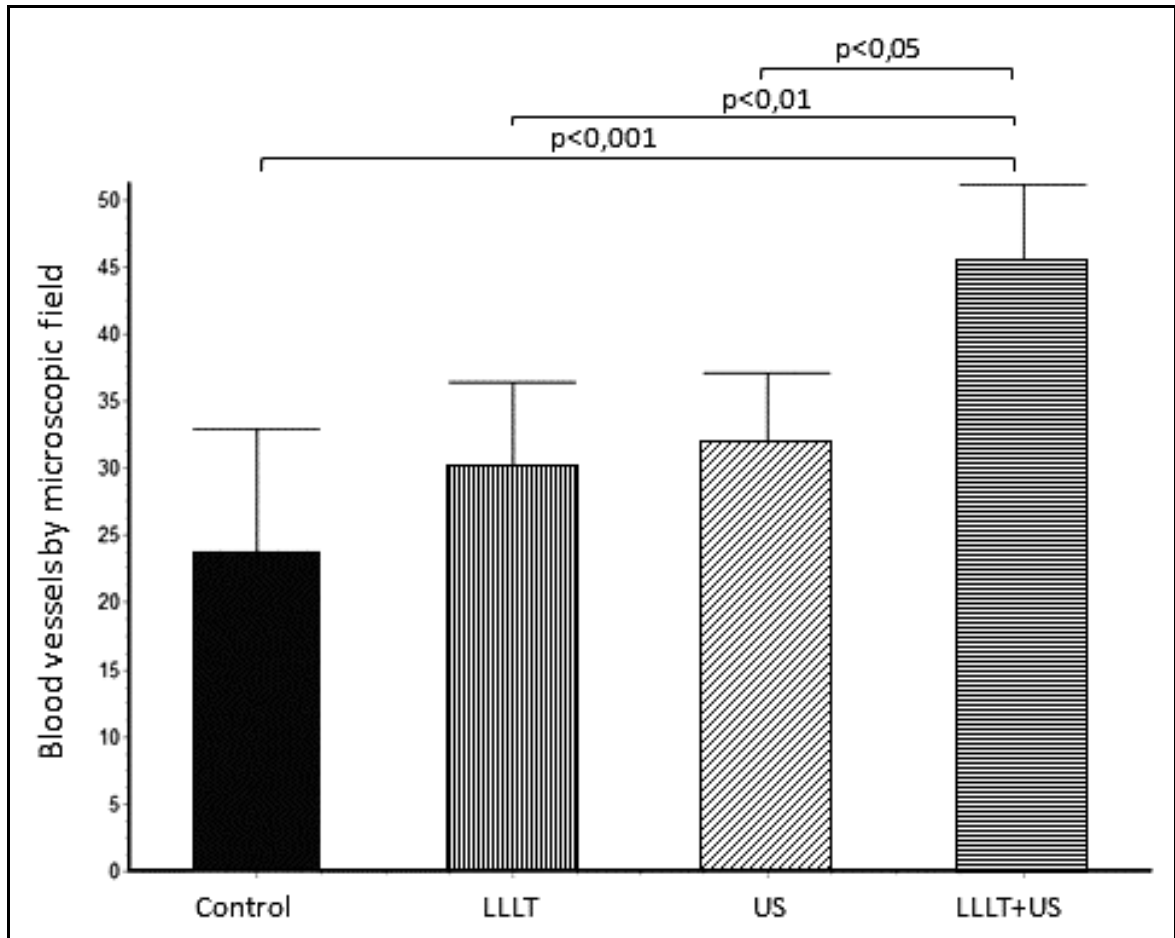


**Figure 4** - Microscopic analysis: hematoxylin and eosin. Original magnification 400X. Scale bars (50  $\mu$ m) are indicated.

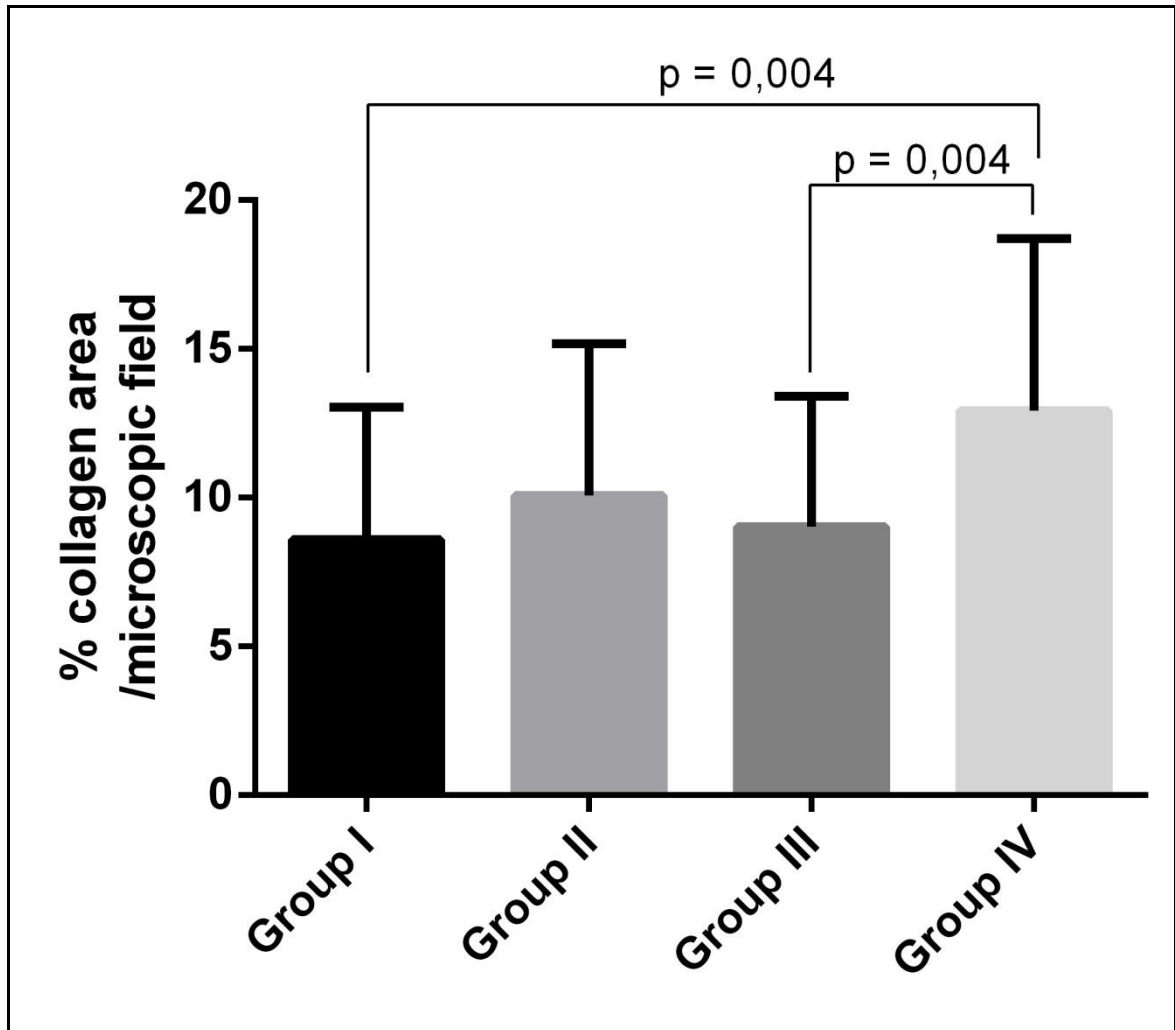




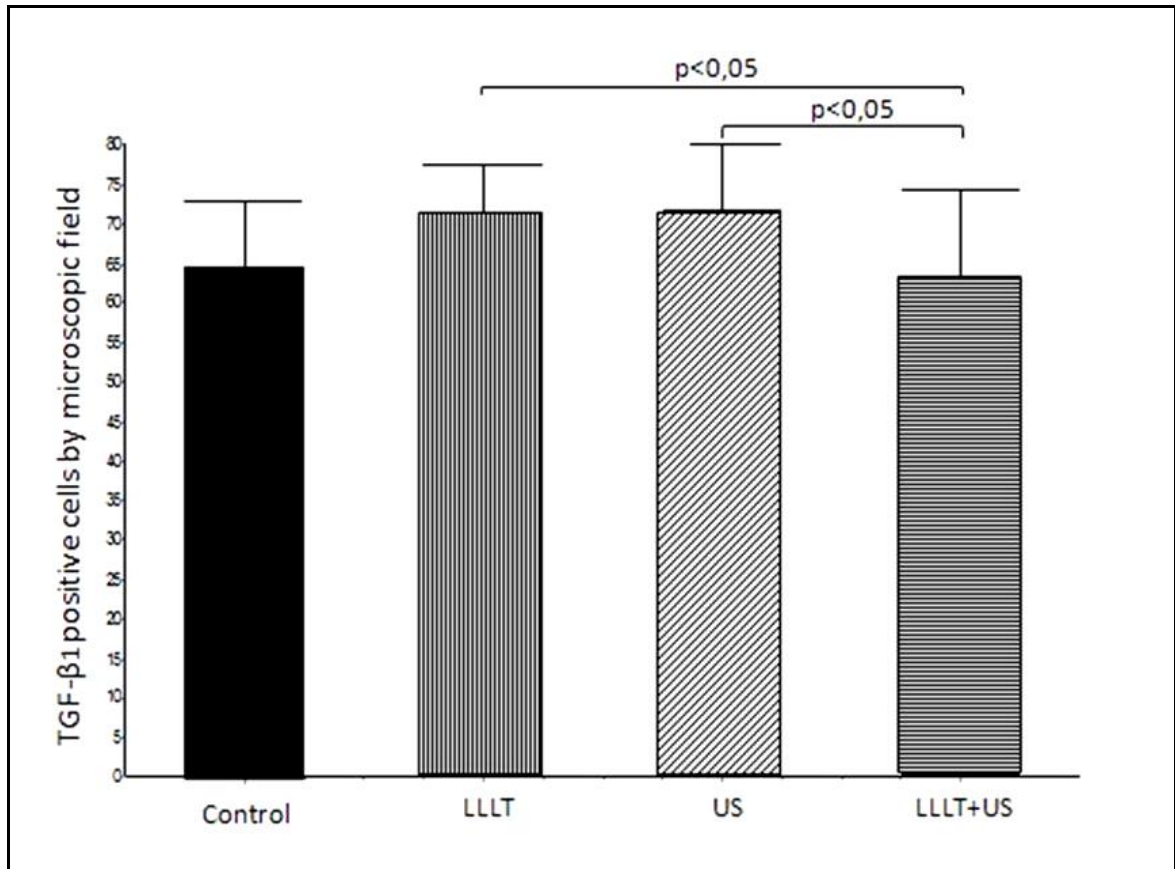
**Graphic 1** - Density of inflammatory cells by microscopic field: results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).



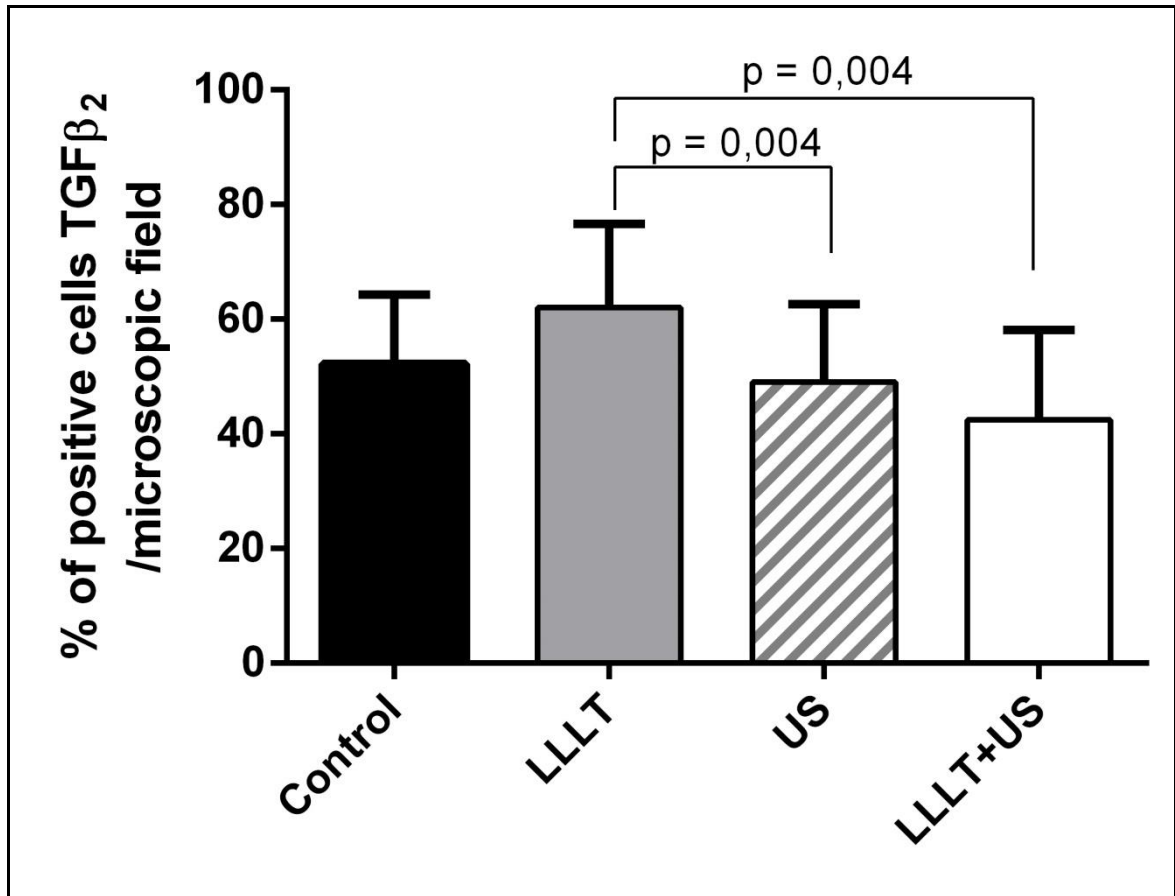
**Graphic 2** - Quantitative measurements of the blood vessels by microscopic field: results are reported as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).



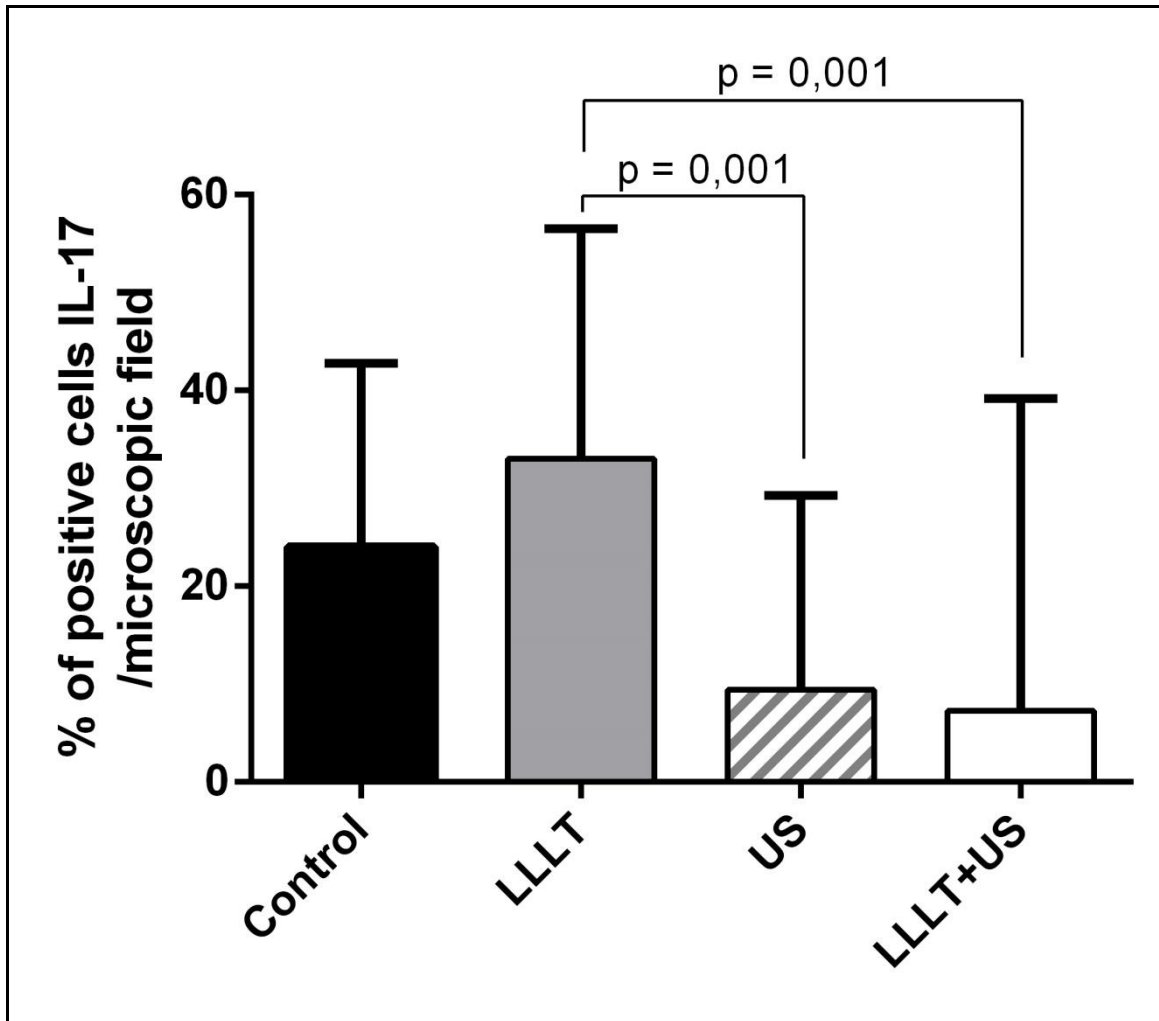
**Graphic 3** - Percentage of collagen matrix by ZEN: results are report as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Graphic 4** - Positive staining of TGF-β<sub>1</sub>: original magnification 400X. Scale bars (50 μm) are indicated. Results are report as mean ± SD. Significant differences (p < 0.05).



**Graphic 5** - Positive staining of TGF- $\beta_2$ : Original magnification 400X. Scale bars (50  $\mu$ m) are indicated. Results are report as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Graphic 6** - Positive staining of IL-17: original magnification 400X. Scale bars (50  $\mu\text{m}$ ) are indicated. Results are report as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p < 0.05$ ).

## References

1. Zhong HL, Wang ZM, Yang ZJ, Zhao F, Wang B, Wang ZC, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$ 1 on the healing of reconstructed dura by carbon dioxide laser soldering in minipigs. *Chin Med J*. 2012; 125: 611-6.
2. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther*. 2001; 81: 1351-8.
3. Feril LBJr, Tachibana K, Ogawa K, Yamaguchi K, Solano IG, Irie Y. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. *J Med Ultrasonics*. 2008; 35: 153-60.
4. Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. *J Orthop Res*. 2006; 24: 1310-6.
5. Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JF. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials*. 2003; 24: 2379-85.
6. Maeshige N, Terashi H, Aoyama M, Torii K, Sugimoto N, Usami M. Effect of ultrasound irradiation on  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expression in human dermal fibroblasts. *Kobe J Med Sci*. 2011; 56: 242-52.
7. Gomez GG, Kruse CA. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol*. 2006; 10: 133-46.
8. Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LF, et al. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res*. 2003; 63: 1860-4.
9. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83: 835-70.

10. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg.* 1994; 220: 10-8.
11. Sporn MB, Roberts AB. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2565-76.
12. Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, Zhang X, Valacca C, Poggio P, et al. TGF- $\beta$ 1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38 $\beta$  to proapoptotic p38 $\alpha$ . *Mol Cancer Res.* 2012; 10: 605-14.
13. Amendt C, Mann A, Schirmacher P, Blessing M. Resistance of keratinocytes to TGF $\beta$ -mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2189-98.
14. Cowin AJ, Hatzirodos N, Holding CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE, et al. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol.* 2001; 117: 1282-9.
15. Jin, W, Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Infect Diseases.* 2013; 60: 2-5.
16. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008; 453: 1051-7.
17. Rocha Junior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 303-7.
18. de Oliveira RG, Aarestrup FM, Miranda C, Vieira BJ, Ferreira AP, Andrade LC. Low-level laser therapy reduces delayed hypersensitivity reaction to ovalbumin in Balb/C mice. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: 773-7.



19. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 2009; 219: 449-58.
20. Shah M, Revis D, Herrick S, Baillie R, Thorgeirson S, Ferguson M, et al. Role of elevated plasma transforming growth factor-beta1 levels in wound healing. *Am J Pathol.* 1999; 154: 1115-24.
21. Wood VT, Pinfield CE, Neves MA, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med.* 2010; 42: 559-65.
22. Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Lasers Surg Med.* 2004; 35: 84-9.
23. Rodero PM, Hodgson SS, Hollier B. Reduced Il17a expression distinguishes a Ly6c(lo)MHCII(hi) macrophage population promoting wound healing. *J Invest Dermatol.* 2013; 133: 783-92.
24. Yamano S, Winston P. Downregulated gene expression of TGF- $\beta$ s in diabetic oral wound healing. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013; 41: 42-8.