



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

**Biossíntese e remodelamento de componentes da matriz
extracelular no processo cicatricial de ratos
hipotireoidianos fotobiomodulados**

VIRGÍNIA DIAS UZÊDA E SILVA

Salvador
2018

VIRGÍNIA DIAS UZÊDA E SILVA

**Biossíntese e remodelamento de componentes da matriz
extracelular no processo cicatricial de ratos
hipotireoidianos fotobiomodulados**

Tese apresentada ao Programa de Pós - graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Doutora em Odontologia e Saúde com área de concentração em Diagnóstico Oral.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Luciana Maria Pedreira Ramalho

Coorientador(a): Prof^a Dr^a Tânia Tavares Rodriguez

Salvador
2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Silva, Virgínia Dias Uzêda e

Biossíntese e remodelamento de componentes da matriz extracelular no processo cicatricial de ratos hipotireoidianos fotobiomodulados. / Virgínia Dias Uzêda e Silva. / Salvador 2018.

104 f.: il.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Luciana Maria Pedreira Ramalho
Coorientador(a): Prof^a Dr^a Tânia Tavares Rodriguez

Tese (Doutorado - Doutorado em Odontologia e Saúde) --
Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia --
UFBA, Salvador 2018.

1. hipotireoidismo. 2. cicatrização de feridas. 3. laserterapia. 4. miofibroblastos e matriz extracelular. I.Ramalho, Luciana Maria Pedreira. II.Rodriguez, Tânia Tavares. III. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE**

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. VIRGÍNIA DIAS UZÊDA E SILVA

**“BIOSSÍNTESE E REMODELAMENTO DE COMPONENTES DA
MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO CICATRICIAL DE
RATOS HIPOTIREOIDIANOS FOTOBIMODULADOS”**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Silvia Regina de Almeida Reis (Examinador Externo)
Professora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Profa. Dra. Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira (Examinador Externo)
Professora da Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Marcelo de Azevedo Rios (Examinador Externo)
Professor da Faculdade Ruy Barbosa

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a toda minha família e entes queridos, por todo o carinho, apoio e atenção. Em especial, a todas as mulheres que dela fazem parte; fortes, batalhadoras, vencedoras. Sempre foram exemplos na minha vida e me fazem ver, a cada dia, que a força que temos é maior do que qualquer obstáculo que nos possa ser imposto. **Vovó Waldelina** onde quer que esteja sei que está torcendo por mim.*

*As minhas vitórias são mais do que minhas, **SÃO NOSSAS!***

"Não há nada mais gratificante do que dirigir a própria vida. Nossas atitudes escrevem nosso destino. Nós somos responsáveis pela vida que temos... A aprendizagem é nossa e ninguém poderá fazê-la por nós, assim como nós não poderemos fazer pelos outros. Quanto mais depressa aprendermos isso, menos sofreremos."

Zibia Gasparetto

AGRADECIMENTOS

São tantos, tão importantes, tão especiais...

À **Deus**, em primeiro lugar, por ter me guiado pelos caminhos certos, nas horas certas e me tornar merecedora de tantas vitórias. Com a tua ajuda mais uma vez venci, mas não cheguei ao fim, e sim ao início de uma longa caminhada.

À minha mãe, **Georgina**, o meu exemplo de vida, pelo seu apoio, esforço, dedicação e amor incondicional, **SEMPRE**. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e junto comigo torná-los realidade.

À meu pai, **Walter**, obrigada pelo seu amor e por sempre tentar fazer de tudo para que eu realizasse os meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos, **Thaise e Vitor**, pelos momentos de risadas, alegrias e companheirismo durante esta vida.

Ao meu sobrinho, **Guilherme**, acompanhar seu crescimento tornam meus dias bem mais divertidos.

Aos meus eternos amigos, tios, avós e primos, em especial **vovó Valdelina, vovó Antonieta, tio Waldeck, tia Rita e tia Geocélia**, obrigada por vibrarem tanto com as minhas conquistas. Vocês são o alicerce do meu eterno encanto pela vida.

À **Profª. Drª Luciana Ramalho**, minha orientadora, agradeço pela confiança depositada no meu trabalho, pelas palavras de apoio, incentivo e por percorrer comigo estes últimos anos. Espero que nossos caminhos continuem seguindo juntos pelas nossas jornadas.

À **Profª. Drª Tania Rodriguez**, minha orientadora, segurou em minhas mãos com todo o carinho e paciência que uma aprendiz necessita para desenvolver novas habilidades. Sua ajuda e contribuição na execução, principalmente experimental, do

meu projeto foram imprescindíveis. Espero que ainda possamos compartilhar muitas experiências.

Aos **Profº. Drº. Jean Nunes e Flávia Caló**, que contribuíram diretamente nas minhas atividades durante todo o doutorado, obrigada por sempre me ouvir e dar contribuições valiosas ao meu trabalho.

Aos meus **Mestres** de ontem e de hoje, espero que tudo que aprendi com vocês perdure para todo sempre, pois foi indispensável ao meu amadurecimento profissional. Obrigada por me ensinarem a amar a arte de ensinar.

Aos colegas do doutorado, **Anderson Maciel, Daniel Rodrigues, Jorge Filho, Lucas Esteves, Márcio Sobral, Mariana Andrade, Paula Paes, Poliana Santos, Rebeca Dantas, Weber Ceo, Wolf Maia**, por estarem ao meu lado nestes últimos anos e dividir cada momento de aprendizagem. Com toda certeza nunca serão esquecidos.

Às amigas **Táise Santos e Rebeca Vasconcelos**, obrigada por compartilharem tantos momentos comigo, nas alegrias e nas dificuldades. A amizade e apoio de vocês foram e sempre serão essenciais, e é por isso que na vida não apenas fazemos amigos, e sim os reconhecemos.

Aos bolsistas de Iniciação científica, **Caique Silva, Rafael Drummond e Lorena Mendonça** agradeço pela enorme dedicação que depositaram à pesquisa e pelos momentos de companhia e descontração, sem dúvidas vocês foram o meu braço direito.

À **Stª Sueli Paixão**, pela paciência, apoio e colaboração em todos os momentos, a **Stª Tayla Pereira** ao **Srº Edilson Amancio** e a **Srª Miriam Moraes**, pela disponibilidade e cuidado nas confecções das minhas lâminas.

À **Capex** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio e investimento na minha qualificação profissional.

Ao **Instituto de Ciências da Saúde da UFBA**, por ceder o espaço para realização do meu projeto e onde passei boa parte da minha pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia**, por ter se tornado a minha casa.

Enfim, agradeço a todos, pois cada gesto, mesmo que parecendo pequeno, me ajudou a chegar aqui com força e esperança. Aprendi que apoio é o que realmente importa e é por isso que: **Ninguém Vence Sozinho!**

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL	20
2.1.1 INFLAMAÇÃO	22
2.1.2 PROLIFERAÇÃO	23
2.1.2.1 MIOFIBROBLASTOS	25
2.1.2.2 COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR	26
2.1.3 REMODELAÇÃO	27
2.2 TIREÓIDE, SÍNTESE E SECREÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS	29
2.3 HIPOTIREOIDISMO	31
2.4 LASER	33
2.4.1 FOTOTERAPIA LASER	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA	38
4.2 AMOSTRA	38
4.2.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	38
4.3 TIREOIDECTOMIA	39
4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL	41
4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	41
4.6 IRRADIAÇÃO A LASER	43
4.7 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	44
4.8 ESTUDO MORFOLÓGICO	45
4.9 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO	46
4.9.1 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA	46
4.9.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	48
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS	50
5.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E PONDERAL	50
5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS	51
5.2.1 ANÁLISE DESCRITIVA	51
5.3 RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	61
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 01	Distribuição dos ratos de acordo com a condição sistêmica, tempo experimental e protocolo de irradiação (UFBA, 2018)	39
Tabela 02	Especificações dos anticorpos utilizados (UFBA, 2018)	47
Tabela 03	Valores médio de células α -SMA positivas nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos	67
Tabela 04	Valores médio de células FSP1 positivas nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos aos 3, 7 e 14 dias.	73
Tabela 05	Análise semiquantitativa da reepitelização na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	100
Tabela 06	Análise semiquantitativa da inflamação aguda na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	100
Tabela 07	Análise semiquantitativa da inflamação crônica na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	101
Tabela 08	Análise semiquantitativa da angiogênese na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria	101
Tabela 09	Análise semiquantitativa da proliferação fibroblástica na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria	102
Tabela 10	Análise semiquantitativa da reepitelização na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	102
Tabela 11	Análise semiquantitativa da imunoexpressão do colágeno tipo I na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	103
Tabela 12	Análise semiquantitativa da imunoexpressão do colágeno tipo III na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	103
Tabela 13	Análise semiquantitativa da imunoexpressão da fibronectina na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.	104
Quadro 01	Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação (UFBA, 2018).	44
Quadro 02	Critérios utilizados na análise histológica (UFBA, 2018).	45
Quadro 03	Critérios utilizados na análise imunoistoquímica (UFBA, 2018).	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Eventos da cicatrização tecidual. Uma linha de tempo da cicatrização de feridas é mostrada com a deposição de MEC, o recrutamento de diferentes tipos de células e a ocorrência dos principais eventos	21
Figura 02	Exposição e dissecação da glândula tireoide (UFBA, 2018).	40
Figura 03	Demarcação dos pontos correspondentes ao ângulo da ferida cirúrgica. Incisão para confecção da ferida e ferida após a sua confecção (UFBA, 2018).	42
Figura 04	Irradiação da ferida cirúrgica com a luz Laser de emissão vermelha (UFBA, 2018).	43
Figura 05	Evolução do peso corporal nos grupo eutireoidiano e hipotireoidiano	50
Figura 06	Reepitelização da ferida. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à reepitelização 2. Fotomicrografia representativa do início da reepitelização no 3º dia após a confecção da ferida no grupo hipotireoidianos laser (A) e hipotireoidiano controle (B). Objetiva de 100x. ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).	55
Figura 07	Comparação entre os grupos Eutireoidiano e Hipotireoidiano Laser avaliados em relação à proliferação fibroblástica ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018)	56
Figura 08	Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidiano avaliados em relação ao infiltrado inflamatório (HC x HL, $p=0,007$ EC x HC, $p=0,015$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).	57
Figura 09	Comparação entre os grupos Hipotireoidiano controle e Laser avaliados em relação à angiogênese ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).	58
Figura 10	Deposição de colágeno. 1. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à deposição de colágeno 2. Fotomicrografia representativa da deposição discreta no grupo hipotireoidiano controle (A) e moderada no grupo hipotireoidiano controle (B). Objetiva de 200x. ($p=0,046$ Teste Exato de Fisher) (UFBA, 2018).	60
Figura 11	Reepitelização da ferida. 1. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à reepitelização 2. Fotomicrografia representativa do 14º dia após	60

a confecção da ferida demonstrando reepitelização completa no grupo hipotireoidianos laser (A) e reepitelização incompleta no grupo hipotireoidiano controle (B). Objetiva de 100x. ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).

- Figura 12** Imunoexpressão do colágeno tipo I. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno I na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Todos os grupos apresentaram evolução da expressão de colágeno tipo I, contudo o grupo EC apresentou maior expressão quando comparado ao HC, e o grupo HL em comparação ao grupo HC aos 3 dias ($P<0,05$). A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunoexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Imagens do 3º e 7º dia (200x), Imagens 14º dia (100x). 65
- Figura 13** Imunoexpressão do colágeno tipo III. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno III na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Todos os grupos apresentaram diminuição da expressão de colágeno III, embora o grupo HC tenha demonstrado maior imunoexpressão aos 3 dias comparado ao grupo EC, da mesma forma o grupo HL se mostrou em relação ao grupo EL ($P<0,05$). A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunoexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Todas as Imagens (200x), exceto Imagem H (100x) 66
- Figura 14** Imunoexpressão da fibronectina. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno I na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Os grupos hipotireoidianos apresentaram diminuição da deposição de fibronectina de modo semelhante ao grupo eutireoidiano. A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle 67

três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens em objetiva de 100x

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 15 | Expressão do α -SMA. 1. Imagem rrepresentativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida no 3º dia após a confecção da ferida nos grupos eutireoidianos controle (A-B) e hipotireoidiano controle (C-D). Objetiva de 100x (A e C) e de 200x (B e D). 2. Comparação entre a expressão do α -SMA nos grupos eutireoidiano e hipotireoidianos controle e irradiados aos 3 dias * ($p=0.000$ Teste ANOVA). | 69 |
| Figura 16 | Fotomicografia da expressão do α -SMA. A. Imagem rrepresentativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida no 7º dia após a confecção da ferida no grupo HC no aumento de 100x . B imagem mais aproximada no aumento de 200x. Em C observam-se com detalhes as células marcadas positivamente pra o α -SMA. | 70 |
| Figura 17 | Fotomicografia da expressão do α -SMA aos 14 dias. A- Imagem representativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida do grupo eutireoidianos controle. Em B, imagem em maior aumento demonstrado a fraca marcação α -SMA. C - D Imagem do grupo hipotireoidiano irradiado com presença de células α -SMA Objetiva de 100x (A e C) e de 200x (B e D). | 71 |
| Figura 18 | Comparação entre os grupos eutireoidianos avaliados em 3, 7 e 14 dias em relação à imunomarcção de FSP1. | 72 |
| Figura 19 | Comparação entre os grupos hipotireoidianos avaliados em 3, 7 e 14 dias em relação à imunomarcção de FSP | 72 |
| Figura 20 | Fotomicografia da expressão do FSP1 nos períodos de 3, 7 e 14 dias. A- Presença discreta de células FSP1 + na área da ferida do grupo eutireoidianos controle. Em B, imagem demonstra aumento na positividade da marcação. C Imagem aos 14 dias demosntrando diminuição na imunorreatividade. Objetiva de 200x. | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina-trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
BA	Bahia
cm	Centímetro
cm ²	Centímetros quadrados
CW	<i>Continuous wave</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
et al.	E colaboradores
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
GaAs	Arseneto de gálio
GaAlAs	Arseneto de gálio-alumínio
g	Grama
°C	Grau Celsius
h	Hora
HeNe	Hélio Neônio
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetros quadrados
Kg	Quilograma
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LTBI	Laserterapia de Baixa Intensidade
LED	<i>Light Emmitting Diode</i> (Diodo emissor de luz)

ml	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatts
min	Minuto
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
p	Probabilidade de erro ou variabilidade amostral
s	Segundo(s)
SAEF	<i>Spatial Average Energy Influence</i> (Densidade de energia média espacial)
t	Tempo
TBE	Tribromoetanol
UFBA	Universidade Federal da Bahia
W	Watts
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado
λ	Comprimento de onda
μm	Micrômetro
Φ	Diâmetro do <i>Spot</i>
%	Porcentagem
®	Marca registrada

RESUMO

Os hormônios tireoidianos influenciam o desenvolvimento e crescimento de diversos órgãos e tecidos, e garantem as demandas metabólicas que interferem no reparo tecidual. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da fototerapia Laser (40mW, 10J/cm², ϕ 0,04cm², CW, *Twin Flex Evolution*, MMOptics®, São Carlos, SP) no reparo tecidual de ratos hipotireoidianos. Setenta e dois ratos Wistar albinus foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo eutireoidiano (E) e grupo hipotireoidiano (H). O hipotireoidismo foi induzido através da tireoidectomia. Cada grupo foi dividido em subgrupos: controle (sem laser) e grupos laser (irradiados). Em seguida, os ratos foram submetidos à anestesia geral para confecção de feridas cutâneas dorsais, excisionais, padronizadas em 1cmx1cm. Os grupos foram subdivididos em EC e HC sem tratamento adicional e EL e HL irradiados pelo protocolo supracitado, imediatamente após o ato cirúrgico e a cada 48 horas durante 3, 7 ou 14 dias. Os ratos foram mortos por aprofundamento anestésico, os espécimes foram processados pela técnica de coloração de rotina Hematoxilina / Eosina (H/E) e imunistoquímica para avaliação do padrão dos componentes da matriz extracelular fibronectina, colágeno I e III, e imunopositividade dos anticorpos α -SMA e FSP1. Os dados foram estatisticamente analisados e os resultados demonstraram que o hipotireoidismo retardou o processo de reparo quando comparado ao grupo eutireoidiano, causando o prolongamento do processo inflamatório ($p=0.015$), o atraso na reepitelização ($p=0.036$), manutenção na deposição de colágeno III ($p=0.01$) em detrimento à deposição de colágeno I ($p=0.021$) que promove maior força tênsil ao tecido. Além disso, retardou a diferenciação miofibroblástica e imunomarcagem de células α -SMA. Quando a laserterapia foi utilizada, pode-se verificar os efeitos biomodulatórios no tecido dos ratos hipotireoidianos. Houve reepitelização nos estágios mais iniciais do processo de reparo ($p=0.046$), além de melhora no processo inflamatório (0.015), maior deposição de colágeno tipo I ($p=0.021$) e neoformação vascular (0.046). Diante dos dados encontrados, conclui-se que o hipotireoidismo modificou o padrão as feridas dos ratos e que a fotobiomodulação a laser contribuiu favoravelmente para melhorar o processo cicatricial, principalmente nas fases iniciais.

Palavras chaves: hipotireoidismo, cicatrização de feridas, laserterapia, miofibroblastos e matriz extracelular.

ABSTRACT

Thyroid hormones influence the development and growth of various organs and tissues, and guarantee as metabolic demands that interfere in tissue repair. The objective of this study was to verify the influence of laser phototherapy (40mW, 10J / cm², ϕ 0.04cm², CW, Twin Flex Evolution, MMoptics®, São Carlos, SP) on the tissue repair of hypothyroid rats. Seventy-two Wistar albinus rats were divided into two experimental groups: Euthyroid group (E) and hypothyroid group (H). Hypothyroidism was induced through thyroidectomy. Each group was divided into subgroups: control (without laser) and laser groups (irradiated). The rats were submitted to general anesthesia for the manufacture of dorsal, excisional, standardized skin wounds at 1cm x 1cm. The groups were subdivided into EC and HC without further treatment and EL and HL irradiated by the aforementioned protocol after the surgical procedure and every 48 hours for 3, 7 or 14 days. Rats were killed by anesthetic deepening, the specimens were processed by routine staining technique Hematoxylin / Eosin (H / E) and immunohistochemistry to evaluate the pattern of components of extracellular matrix fibronectin, collagen I and III, and immunopositivity of α -SMA and FSP1. The data were statistically analyzed and the results showed that hypothyroidism delayed the repair process when compared to the euthyroid group, causing prolongation of the inflammatory process ($p=0.015$), delayed reepithelialization ($p=0.036$), maintenance of deposition of collagen III ($p = 0.01$) in detriment to the deposition of collagen I ($p = 0.021$) that promotes greater tensile strength to the tissue. Also, delay the myofibroblastic differentiation and immunostaining of α -SMA cells. When laser therapy was used, it was possible to verify the biomodulatory effects in the tissue of the hypothyroid rats, there was reepithelialization of the earliest stages of the repair process ($p = 0.046$), as well as an improvement in the inflammatory process (0.015), a greater deposition of collagen type I ($p = 0.021$) and vascular neoformation (0.046). According to the data, it is concluded that hypothyroidism modified the pattern as wounds of rats and that a laser photobiomodulation contributed favorably to improve the cicatricial process, especially in the initial phases.

Keywords: hypothyroidism, wound healing, laser therapy, myofibroblasts and extracellular matrix.

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização tecidual é um processo fisiológico normal que substitui o tecido lesionado e envolve as três contínuas, sobrepostas, mas bem ordenadas fases: inflamação, proliferação e remodelação. Nesse processo, interagem uma variedade de células, citocinas, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular, logo após a lesão tecidual (Beldon et al., 2010, Barrientos et al., 2008).

Fatores exógenos e endógenos podem retardar os mecanismos de reparo (Eissa & Wasil., 2017; Uzêda *et al.*, 2016; Paraguassu *et al.*, 2014; Kilik *et al.*, 2010) ou alterar a integridade do tecido e predispor às condições patológicas. Por isso, é fundamental que haja um processo completo e eficiente da cicatrização da ferida, garantindo, desta forma, o bem-estar dos indivíduos (Guo & DiPietro, 2010; Schweinberger & Roukiis, 2009).

Os hormônios tireoidianos têm um importante papel no desenvolvimento e crescimento de órgãos e tecidos e exercem uma ampla variedade de efeitos que são essenciais para a manutenção da qualidade de vida (Hayat et al., 2016; Antonini et al., 2013). O desequilíbrio nas concentrações destes hormônios pode ocasionar o seu excesso ou a sua falta e, portanto, afetar diversos sistemas biológicos (Chang et al., 2014; Petel et al., 2016).

O retardo na cicatrização de feridas é um dos prejuízos que tem sido observado no pós-operatório de pacientes hipotireoidianos, sejam eles submetidos à tireodectomia total (Nassif et al., 2008; Natori et al., 1999), à radioterapia na região de cabeça e pescoço (Miller & Agrawal, 2009) ou induzidos ao hipotireoidismo por drogas antitireoidianas (Ramalho et al., 2010; Hayat et al., 2010).

Desta forma, a hipofunção da glândula tireoide pode estar relacionada ao advento de complicações pré e pós-operatórias. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que, devido ao fato dos hormônios tireoidianos estarem envolvidos no processo de cicatrização através da estimulação da proliferação fibroblástica e síntese de colágeno (Safer, 2013; Natori, 1999). A cicatrização das feridas pode ser prejudicada no hipotireoidismo, devido à menor deposição de colágeno e,

conseqüentemente, prolongamento da fase proliferativa do reparo (Paraguassu et al., 2014; Nassif et al., 2008).

Na busca pela melhora no resultado das intervenções cirúrgicas que necessitem de um reparo tecidual adequado, várias modalidades terapêuticas têm sido pesquisadas no intuito de modular o processo cicatricial (Rettinger et al., 2017; Uchinaka et al., 2017; Shen et al., 2017, Kim et al., 2013; Liem et al., 2013). Neste contexto, a incorporação da fototerapia a laser tem sido amplamente difundida em inúmeras áreas biomédicas com o propósito de acelerar o processo de cicatrização, em especial de tecidos em que a cicatrização está sendo comprometida pela associação de distúrbios sistêmicos (Eissa et al., 2017; Uzêda e Silva et al., 2016; Paraguassu et al., 2014, Pires-Oliveira et al., 2010; Pinheiro et al., 2009).

O uso da fototerapia tem apresentado grande relevância na cicatrização de feridas devido aos efeitos biomodulatórios promovidos aos tecidos, pois é capaz de aumentar a síntese de colágeno, angiogênese, além de estimular a diferenciação miofibroblástica nas fases iniciais da cicatrização (Akilbekova, Boddupalli & Bratlie, 2017; De Castro et al., 2014, Colombo et al., 2013). A hipofunção tireoidiana comprovadamente interfere negativamente no reparo tecidual (Zimmermann et al., 2009; Konstantinos & Zografos, 2006) e os benefícios da laserterapia em modelos de hipotireoidismo já foram demonstrados (Paraguassu et al. 2014, Ramalho et al., 2010).

Na fase proliferativa do reparo, inicia-se o processo de contração da ferida realizado pelos miofibroblastos, células mesenquimais de formato fusiforme ou estrelado que exibem propriedades intermediárias de fibroblastos e de células da musculatura lisa (Gabbiani et al., 1971; Klingberg, Hiz, White, 2013; Elliot et al., 2012). Estas são células chave no processo de reparo tecidual, por promover a contração através do direcionamento das bordas da ferida para o centro (Bochaton-Piallat, Gabbiani, Hiz et al., 2016; Hinz *et al.*, 2012, Gabbiani, 2003).

Embora os miofibroblastos sejam essenciais no processo de reparo, a persistência destas células na ferida pode promover uma deposição aumentada de matriz extracelular e formação de fibroses (Desmoulié`Re, Chaponnier & Gabbiani, 2003). Já tendo sido relatado o desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas em

pacientes com hipertireoidismo (Zhang et al., 2016; Woller et al., 2016). Em contrapartida, não há estudos que avaliem a atividade dos miofibroblastos no reparo tecidual de hipotireoidianos.

Nos últimos anos, avanços tem sido feito no entendimento do perfil de expressão dos componentes da matriz extracelular (MEC) (Kibe et al., 2017; Sabol et al., 2012) e das características biológicas do miofibroblasto e a sua participação nos processos biológicos e patológicos (Bochaton-Piallat, Gabbiani, Hiz et al., 2016; Gabbiani, 2003). Entretanto, alguns questionamentos persistem e, compreender como o processo de reparo tecidual pode ser modulado é essencial para o adequado processo de cicatrização. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar, através de análise histológica e imunoistoquímica a ação da fototerapia laser na expressão de componentes da matriz extracelular e no perfil miofibroblástico de ratos hipotireoidianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

A pele é o maior órgão do corpo de vertebrados, e desempenha papel crucial na regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo e funções sensoriais. Aliado a isso, sua integridade é necessária para criar uma barreira de proteção contra injúrias do meio ambiente (Rettinger et al., 2017; Sabol et al., 2012). Disfunções no processo de cicatrização da pele podem resultar em problemas cosméticos, desordens metabólicas e infecções letais (Li et al., 2014).

O processo de reparo tecidual pela cicatrização é um mecanismo de sobrevivência que se inicia imediatamente após a injúria tecidual, pelo qual o tecido destruído ou danificado é removido e a integridade é restaurada. (Beldon, 2010). Este é um processo complexo, dinâmico e interativo que envolve uma série de eventos incluindo quimiotaxia, divisão celular, neovascularização e síntese de matriz extracelular. Estes eventos são regulados pela integração de mediadores como plaquetas, células inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular (Andreoli *et al.*, 2014; Klingberg, Hinz & White 2013).

A cicatrização tecidual progride em uma sequência temporal de fases envolvendo, resposta inflamatória, proliferação celular, angiogênese e remodelação (Guo & Dipietro, 2010). Para a cicatrização normal de feridas, a sequência temporal destes eventos deve ser mantida. Interrupções, defeitos e prolongamento de uma destas etapas pode causar atraso na cicatrização ou o não fechamento da ferida (Uzêda e Silva *et al.*, 2016). Este tem sido um problema de saúde pública mundial, especialmente em pacientes com problemas de saúde sistêmicos que interferem no processo de cicatrização. Por isso, diversos estudos são realizados mundialmente na tentativa de fornecer um adjuvante para a cicatrização destes grupos de pacientes (Eissa et al., 2017; Uzêda e Silva et al., 2016; Paraguassu et al., 2014, Pires-Oliveira et al., 2010; Pinheiro et al., 2009)

A produção e organização dos componentes da MEC é uma parte fundamental para o reparo tecidual (Sousa *et al.*, 2014; Bielefeld *et al.*, 2011; Lenselink, 2015) (Figura 1). A MEC sofre dinâmica interação com as células e, além de oferecer suporte, também é essencial para a adesão, motilidade, crescimento e diferenciação celulares. Em feridas cutâneas crônicas, o atraso da cicatrização pode ser atribuído à composição defeituosa da MEC e remodelação ineficiente (Magnes, 2007; Nagase, Visse & Murphy, 2006).

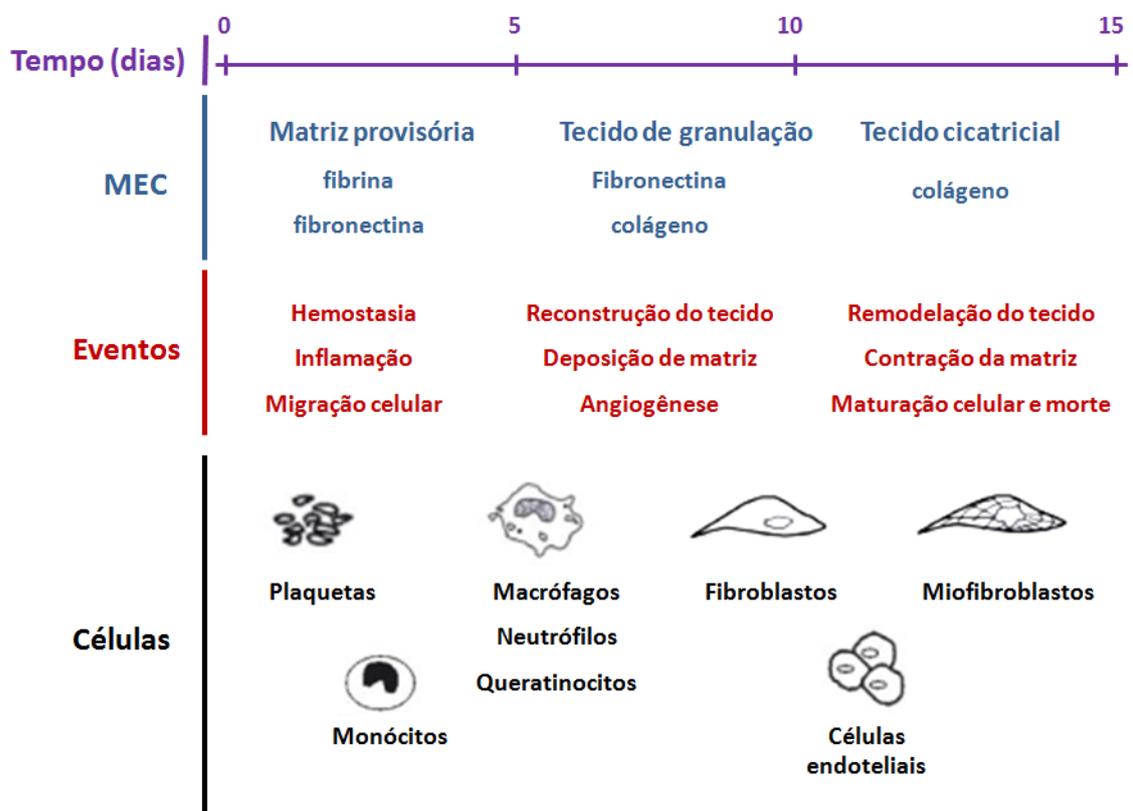


Figura 1 - Eventos da cicatrização tecidual. Uma linha de tempo da cicatrização de feridas é mostrada com a deposição de MEC, o recrutamento de diferentes tipos de células e a ocorrência dos principais eventos (Adaptado de Midwood *et al.*, 2004).

2.1.1 INFLAMAÇÃO

Imediatamente após a ocorrência da ferida, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas, ocorrendo assim a vasoconstricção, agregação plaquetária e deposição de fibrina para a formação do coágulo (Guo & Dipietro, 2010; Monaco & Lawrence, 2003). As plaquetas presas no coágulo liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante Beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) que iniciarão a cascata de cicatrização da ferida pela ativação de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos. O coágulo também fornece uma matriz provisória rica em glicoproteínas adesivas como a fibronectina, essencial para migração celular (Beldon, 2010; Enoch & Leaper, 2007).

O coágulo, formado pelo processo de hemostasia, evita que mais fluidos e eletrólitos sejam perdidos pela ferida e limita a contaminação pelo ambiente exterior. O processo de cicatrização não pode prosseguir até que a hemostasia esteja finalizada. Quando o sangramento é controlado, células inflamatórias migram para a ferida e promovem a fase inflamatória, que é caracterizada pela infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Guo & Dipietro, 2010; Monaco & Lawrence, 2003).

Uma das principais funções da inflamação é levar células inflamatórias para a área lesionada; elas fagocitam bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos para que o processo de reparo possa continuar (Al-Watban & Zhang, 2004; Monaco & Lawrence, 2003). As primeiras células a chegarem ao local são os neutrófilos, atraídos pelos agentes quimiotáticos liberados pelas bactérias (ou células lesadas). No 2º a 3º dia, os neutrófilos começam a desaparecer por apoptose ou fagocitose pelos macrófagos. O processo de limpeza da ferida é continuamente realizado pelos monócitos que estão presentes desde o início da inflamação e se diferenciam em macrófagos, sendo estas as células mais importantes na fase final do processo inflamatório (Beldon et al., 2010).

Uma vez ativado, o macrófago é responsável pela liberação de fatores de crescimento (PDGF e TGF- β) responsáveis pela proliferação que atraem os fibroblastos e as células da musculatura lisa para dentro da ferida, como também células endoteliais que participarão do processo de angiogênese (Beldon, 2010; Guo & Dipietro, 2010). Qualquer inibição na função dos macrófagos retarda a cicatrização das feridas, conduzindo a um pobre debridamento da ferida, atraso na proliferação de fibroblastos, angiogênese e fibrose inadequados. O resultado da fase inflamatória é o controle da inflamação e o estabelecimento de um leito de ferida limpa. Esta fase dura aproximadamente 3 dias (Beldon, 2010; Enoch & Leaper, 2007).

2.1.2. PROLIFERAÇÃO

A fase proliferativa geralmente segue e se sobrepõe à fase inflamatória, e é representada pela proliferação e migração epitelial sobre a matriz provisória no interior da ferida. Este processo é caracterizado principalmente pela angiogênese, formação do tecido de granulação, deposição de colágeno, epitelização e contração da ferida (Yong & Mcnaught, 2011). Esta fase se inicia no 3º dia até a segunda semana depois da injúria, e o ambiente celular e as células inflamatórias, inicialmente presentes na matriz provisória, são substituídas por fibroblastos e células endoteliais (Monaco & Lawrence, 2003).

Os queratinócitos são os principais componentes celulares da epiderme, sendo essenciais na reepitelização da ferida. Durante a cicatrização, os queratinócitos são submetidos à migração, proliferação e diferenciação, a fim de manter a integridade da barreira da pele (Shen *et al.*, 2017). Os estímulos que iniciam a ativação do queratinócito incluem fatores de crescimento e citocinas (Monaco & Lawrence, 2003). O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um dos fatores de crescimento mais bem caracterizados na cicatrização de feridas na pele. Nas feridas agudas, o EGF é principalmente secretado por plaquetas, macrófagos e fibroblastos e é regulado imediatamente após a injúria ao tecido. A liberação de EGF estimula a proliferação e migração das células epiteliais, contribuindo assim para reepitelização (Kusewitt *et al.*, 2009; Haase *et al.*, 2003).

Os fibroblastos são o tipo celular mais abundante no reparo tecidual. Eles proliferam e migram para a matriz extracelular provisória da ferida oriundos dos fibroblastos presentes nos tecidos adjacentes, ou pela transformação de células mesenquimais indiferenciadas ao redor da área, que influenciadas pelas citocinas, podem se transformar em fibroblastos (Williamsom & Harding, 2004; Monaco & Lawrence, 2003). A proliferação é estimulada por uma variedade de citocinas, sendo as mais importantes o PDGF e TGF- β (Yong & Mcnaught, 2011; Enoch & Leaper, 2007).

Uma vez no interior da ferida, os fibroblastos produzem proteínas da matriz como a fibronectina e o ácido hialurônico e, mais tarde, o colágeno e proteoglicanos. Estes componentes ajudam a construir uma nova matriz extracelular dando suporte à migração celular, essencial para o processo de reparo (Agren & Werthen, 2007). Recentemente, os fibroblastos têm sido identificados através da proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1), este marcador, também referido com S100A4, foi descoberto em 1995 e pertence à superfamília das proteínas de ligação ao cálcio citoplasmático S100. Ele é reativo em fibroblastos de diferentes órgãos em remodelação e no estroma tumoral.

A formação dos novos capilares, a partir de vasos preexistentes (angiogênese), é responsável pelo fornecimento de oxigênio, especialmente na produção de energia por meio de ATP e nutrientes necessários ao metabolismo celular no local. Nesta fase as células consomem 3 a 5 vezes mais oxigênio do que em fases de repouso no ciclo celular (Monaco & Lawrence, 2003).

Os fibroblastos produzem uma larga quantidade de colágeno e adquirem um fenótipo miofibroblástico, caracterizado pelo aumento na expressão de actina de músculo liso (SMA). Os miofibroblastos podem surgir a partir da diferenciação de uma célula mesenquimal indiferenciada ou de fibroblastos, os quais, se transformam em miofibroblastos através da interação com a matriz extracelular e influenciados por citocinas como o TGF- β , PDGF, FGF (Elliot et al., 2011; Hinz et al., 2007). Estas células exercem papel importante na promoção da contração da ferida (Enoch & Leaper, 2007).

2.1.2.1 Miofibroblastos

Os miofibroblastos foram descritos pela primeira vez na cicatrização de feridas na pele por Gabbini et al. (1971) quando postularam que estas células eram responsáveis pelo fenômeno da contração da ferida. Desde então, células morfológicamente semelhantes aos miofibroblastos foram descritas em muitos tecidos e, predominantemente em processos patológicos, sendo a sua presença um marcador de fibroses e cicatrizes hipertólicas (Bochaton-Piallat, Gabbiani, Hinz, 2016; Gabbiani et al, 2003).

Posteriormente verificou-se que os miofibroblastos são, na verdade, fibroblastos que adquirem a capacidade de expressar a actina de músculo liso, um microfilamento que compõe o citoesqueleto de todas as células musculares lisas de mamíferos, células mioepiteliais, e é particularmente abundante em células musculares lisas de paredes dos vasos, tendo importante função contrátil (Santana et al., 2015; Andreoli et al., 2014; Elliot et al., 2011). Os miofibroblastos possuem retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, resultado da síntese e secreção de citocinas, hormônios, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e proteases. Ultraestruturalmente, os miofibroblastos estão organizados sob a forma de feixes de filamentos de α -SMA conectados aos complexos de adesão especializados que se localizam na superfície celular, denominados fibronexos, caracteristicamente observados em miofibroblastos (Eyden, 2008).

O anticorpo alfa actina de músculo liso (α -SMA) reage especificamente com a isoforma de actina de músculo liso α . E por isso, através deste marcador, é possível quantificar os miofibroblastos presentes na lesão, e este é considerado o melhor marcador miofibroblástico (Santana et al., 2015; Andreoli et al., 2014; Elliot et al., 2011; Ribeiro et al., 2009). Recentemente, Desai et al. (2014) demonstraram que o tratamento de células tronco mesenquimais com TGF- β desenvolve um fenótipo miofibroblástico com alta expressão de α -SMA e que o contrário também pode ser modulado, e o uso do bFGF pode reverter o fenótipo miofibroblástico, o que seria uma estratégia favorável para o desenvolvimento de terapia antifibróticas.

Embora os primeiros conhecimentos dos miofibroblastos tenha sido referido a sua função no processo de cicatrização, atualmente, sabe-se que os miofibroblastos desenvolvem funções muito importantes não só na reparação de tecidos, mas também na progressão tumoral (Eyden, 2008).

2.1.2.2 Componentes da Matriz extracelular

As macromoléculas que compõem a MEC desempenham funções importantes e distintas e a sua organização é um processo dinâmico cuja composição é modificada durante os processos fisiológicos e patológicos (Andreoli *et al.*, 2014; Labat-Robert, 2012; Agren & Werthen, 2007).

A fibronectina é uma glicoproteína encontrada em todos os tecidos e é essencial em diferentes interações célula - MEC. Ela desempenha papel fundamental na estruturação tridimensional da MEC fornecendo conexão para as células através de receptores, como as integrinas. Além da adesão, ela também atua na migração de fibroblastos, quimiotaxia de monócitos, regulação do crescimento celular e expressão gênica (Lenselink, 2015, Sousa *et al.*, 2014). De acordo com Bielefeld *et al.* (2011), a expressão diminuída da fibronectina promove uma desregulação na atividade dos fibroblatos e com isso promove uma cicatrização insatisfatória das feridas.

A molécula de fibronectina existe sob duas formas principais: fibronectina plasmática e à fibronectina celular. A fibronectina plasmática é uma proteína solúvel, sintetizada pelos hepatócitos, que se liga à fibrina auxiliando na estabilização do coágulo. Ela preenche as lacunas das lesões e atua como substrato para deposição de MEC e formação de matriz provisória nos estágio inicial da cicatrização das feridas (Agren & Werthen, 2007). A forma celular da fibronectina é uma proteína insolúvel, produzida por fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, importante para a formação do tecido de granulação (Lenselink, 2015; Midwood *et al.*, 2004).

No início do processo de cicatrização, a matriz é composta de proteínas derivadas em grande parte das plaquetas e do plasma. Com a migração dos macrófagos até a ferida e a subsequente formação de tecido de granulação, os componentes da MEC são manufaturados pelas células *in situ*. A MEC de tecidos

cicatriciais passa, na verdade, por mudanças muito rápidas. A fibrina do tampão, por exemplo, é substituída por fibronectina e ácido hialurônico e depois por colágeno III e I (Labat-Robert, 2012; Agren & Werthen, 2007).

Uma das proteínas mais abundantes da MEC é o colágeno, correspondendo a 25% da composição total de proteínas dos mamíferos (Oliveira et al., 2017). Os diversos tipos de tecido conjuntivo devem suas características específicas ao tipo de colágeno que possuem, sua quantidade e a outros componentes distribuídos na MEC.

Os colágenos fibrilares englobam os tipos I, II, III, V, XI presentes em pele, mucosas, ossos, ligamentos, cartilagem, vasos e órgãos. Os colágenos associados às fibrilas com tripla hélice ininterrupta agrupam os tipos IX, XII e XIV, XIX, XX e XXI localizando-se sobre os colágenos fibrilares e ligando-os entre si e a outros componentes da MEC, sendo encontrados em cartilagens, tendões, vasos e ligamentos (Ferreira et al., 2012; Chung & Uitto, 2010). O colágeno Tipo IV é organizado em um entrelaçamento dentro das membranas basais, enquanto o Tipo VI forma microfibrilas distintas e o Tipo VII forma fibrilas de ancoragem (Oliveira et al., 2017).

O papel do colágeno na cicatrização de feridas tem sido bem difundido, estando em destaque os colágenos do tipo I e III (Maligliere et al., 2017; Slavskovky et al., 2011; Busnardo & Biondo-Simões, 2010). Desta forma, a secreção de componentes da MEC, como fibronectina e colágeno pelos fibroblastos durante a fase proliferativa é crucial para o sucesso do reparo tecidual, pois essas moléculas são necessárias para reestabelecer a força mecânica da ferida (Bielefeld *et al.*, 2011).

2.1.3 REMODELAÇÃO

A terceira e última fase do processo de cicatrização é a remodelação. Esta é uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal e sua principal característica é a deposição de colágeno na ferida (Agren & Werthen, 2007)

A síntese e a remodelação da matriz extracelular é iniciada simultaneamente ao desenvolvimento de tecido de granulação e continua por longos períodos (Bielefeld et al, 2010; Midwood et al., 2004). Na fase inicial da cicatrização, há deposição abundante de colágeno tipo III, mais tarde, este vai sendo gradativamente degradado e substituído pelo colágeno tipo I, que muda a conformação de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para entrelaçadas e organizadas (Maligliere et al., 2017; Slavskovsky et al., 2011; Busnardo & Biondo-Simões, 2010).

A degradação de colágeno é realizada pela ação das metaloproteinases da matriz (MMP), que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação da MEC. Por esse motivo, essas enzimas estão envolvidas em vários processos patológicos sistêmicos (Araújo et al., 2010; Chen et al., 2007). A atividade dessas enzimas é regulada, principalmente, através de inibidores proteicos teciduais denominados inibidores de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs e seus inibidores determinam a arquitetura da MEC (Nagase, Visse & Murphy, 2006).

Como o decorrer do processo, as atividades celulares vão diminuindo com redução do fluxo sanguíneo, regressão no crescimento de capilares, redução da atividade de macrófagos e fibroblastos, sendo que estes começam a desaparecer do local da ferida por mecanismos de emigração ou apoptose. Esta finalização de atividade celular leva a formação da cicatriz (Mendonça & Coutinho-Neto, 2009).

A formação de cicatrizes hipertróficas ou fibroses é caracterizada pela desregulação no processo normal e a persistência dos miofibroblastos na ferida, com o consequente acúmulo de MEC e contração do tecido, levando à deformação e alteração das suas funções normais. (Klingberg, Hinz & White, 2013; Desmoulière, Chaponnier & Gabbiani, 2005).

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar mecanismos capazes de interferir nesta complexa cadeia de eventos do processo de reparo (Zhong et al., 2010). Além destes fatores intrínsecos ao organismo, algumas condições locais ou sistêmicas podem contribuir para o prolongamento destas fases, e desta forma, agravar o reparo (Guo & Di Pietro, 2010).

Vascularização inadequada, infecção, presença de trauma, são alguns dos fatores que podem influenciar diretamente no reparo (Tandara & Mustoe, 2004). Aliado a isso, condições como diabetes não controlada, anemia, obesidade, desnutrição, hipotireoidismo e idade são outras situações que podem contribuir para o retardo no reparo tecidual (Uzêda e Silva et al., 2016; Pinheiro et al., 2009; Schweinberger & Roukis, 2009).

2.2 TIREOIDE, SÍNTESE E SECREÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A tireoide é uma glândula que compõem o sistema endócrino, disposta por dois lobos, em formato de borboleta, localizada nas regiões laterais e anterior da traqueia, e mantêm íntimo contato com as glândulas paratireoides (Patel et al., 2013). Assim como as outras glândulas do sistema endócrino, a tireoide recebe estimulação do eixo hipotálamo-hipófise para desempenhar sua atividade. Sendo uma das maiores glândulas endócrinas, no adulto, normalmente pesa de 15 a 20 gramas e secreta dois hormônios principais, a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4) (Safer, 2013; Garber et al., 2012).

A síntese dos hormônios tireoidianos compreende uma série de reações bioquímicas específicas que estão intimamente relacionados com a organização histológica do tecido tireoideano (Carvalho & Dupuy, 2017; Brent, 1994). Os folículos tireoidianos, unidade funcional da tireoide, são estruturas revestidas por uma monocamada de células epiteliais cuboides que secretam seus produtos para o interior dos folículos. Em seu interior, contém um coloide enriquecido com glicoproteínas denominadas de tireoglobulinas, essas unidades são responsáveis pela síntese e armazenamento dos principais hormônios da tireoide (Carvalho & Dupuy, 2017; Wissig, 1963).

A função endócrina da glândula tireoide tem fundamental importância para a regulação metabólica no organismo. E para que haja a formação adequada dos hormônios tireoidianos, é necessária a ingestão de níveis consideráveis de iodo da dieta (Garber et al., 2012). O iodeto ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal e atinge as membranas plasmáticas através da circulação sanguínea. Este é capturado pelas células foliculares e encaminhados ao coloide; a captação de iodeto

pela tireoide é influenciada por diversos fatores, dos quais o mais importante é o estímulo pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Mezzomo & Nadal, 2016; Marsili et al., 2011)

A tireoglobulina é a principal glicoproteína produzida pelas células tireoidianas, correspondendo a maior parte do conteúdo proteico da glândula. Ela é sintetizada no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi e liberadas por exocitose para o coloide folicular. Cada molécula de tireoglobulina contém aminoácidos de tirosina, que são os principais substratos combinados ao iodo para a biossíntese dos hormônios tireoidianos (Carvalho & Dupuy, 2017; Wing, 1963).

Após a conversão dos íons iodeto para uma forma oxidada de iodo, este se conjuga com a tirosina unicamente ou duplamente, formando as monoiodotirosinas e diiodotirosinas. Continuadamente, cada vez mais moléculas de iodotirosina se acoplam umas às outras. Quando ocorre o acoplamento de uma molécula de monoiodotirosina com uma molécula de diiodotirosina obtém-se a triiodotironina (T3). Quando ocorre a união de duas moléculas de diiodotirosina obtém-se a tetraiodotironina (T4), que é o principal produto hormonal desta reação (Carvalho & Dupuy, 2017; Cioffi et al., 2013).

Quando secretados, cerca de 93% dos hormônios são formados de tiroxina e apenas 7% por triiodotironina. Entretanto, aproximadamente metade da tiroxina é lentamente convertida em T3 através de uma família enzimática, denominada desidases. Ambos apresentam semelhante importância do ponto de vista funcional, mas o T3 apresenta atividade biológica de três a quatro vezes maior que o T4, pois este é o principal hormônio transportado e utilizado pelos tecidos (Chang et al., 2014, Patel et al., 2013).

Devido à alta afinidade das proteínas plasmáticas de ligação dos hormônios tireoidianos estas substâncias são liberadas lentamente para as células teciduais (Hayat et al., 2010; Ritchie et al., 2003). Ao penetrar nas células, ambos os hormônios se ligam novamente às proteínas intracelulares e são novamente armazenadas. As mitocôndrias são consideradas o maior compartimento de T3, por isso como sugerido por Sterling et al., em 1975, a ação do hormônio tireoidiano não é apenas no núcleo, mas também na mitocôndria e, por isso pode afetar diretamente

a atividade mitocondrial, aumentando o número e a atividade desta organela, o que eleva a taxa de formação de ATP para fornecer energia para as funções celulares (Wrtuniak-Cabello et al., 2017; Cioffi et al., 2013).

Os hormônios tireoidianos são fundamentais nos processos metabólicos do indivíduo, podendo aumentar em até 70% a capacidade metabólica basal do organismo. Desta forma, agem em quase todas as células do corpo e influenciam nas reações de síntese e degradação de proteínas, lipídios e carboidratos, e na modulação de vitaminas e outros hormônios (Westmuckett et al, 2013, Hayat et al.,2010). E tem um forte impacto no sistema cardiovascular, nervoso, muscular e na regulação do peso corporal. Ao contrário, quando sua produção cessa a taxa metabólica cai quase até a metade do normal (Ritchie et al., 2003). Assim, quaisquer alterações nos níveis de hormônios produzidos acarretam em mudanças nos tecidos e sistemas do organismo como um todo.

2.3 HIPOTIREOIDISMO

As disfunções da tireoide são consideradas como algumas das endocrinopatias mais importantes, por causarem problemas em uma grande parcela da população em todo o mundo. Estas podem ocorrer na forma de hipotireoidismo ou hipertireoidismo (Patel et al., 2013, Jongh et al., 2011). O hipotireoidismo é caracterizado pela deficiência ou ausência dos hormônios tireoidianos T3 e T4, podendo ocorrer em indivíduos de todas as idades e afetar diversos órgãos e sistemas. O hipertireoidismo, ao contrário, é caracterizado pelo excesso na produção dos hormônios (Chang et al., 2014; Hayat et al.,2010).

O hipotireoidismo pode apresentar três diferentes classificações em relação ao nível da desordem (primário ou secundário – ocorre por disfunção central da regulação endócrina), quanto ao momento da apresentação (Congênito ou adquirido) e em consideração da gravidade (clínico ou subclínico) (Safer et al., 2013, Patel et al., 2013, Garber et al., 2012).

O hipotireoidismo primário ocorre quando as alterações são provenientes da tireoide, com conseqüente aumento do TSH a fim de estimular a glândula a produzir

seus hormônios que encontram-se diminuídos. Pode ser consequência da deficiência na ingestão de iodo, do tratamento de neoplasias malignas através da irradiação da região do pescoço, tireoidectomia parcial ou total, atrofia idiopática da glândula, tireoidite autoimune crônica ou a um efeito secundário devido ao uso de medicamentos. Já o hipotireoidismo secundário é caracterizado pela deficiência de TSH devido a insuficiência hipotálamo – hipofisária (Brenta et al., 2013; Gaitonde, Rowley & Sweeney, 2012)

Estudos experimentais associados à disfunção tireoidiana e alterações no metabolismo e desenvolvimento do corpo são baseados na supressão da produção de hormônio promovendo um estado de hipotireoidismo. Os modelos de indução do hipotireoidismo mais utilizados consistem na técnica da tireoidectomia, com a realização da dissecação da glândula tireoide (Patel et al. 2013). Bem como o uso de drogas antitireoidianas como o propiltiouracil (PTU) e o metimazol (MMI) que inibem a síntese destes hormônios (Uzêda e Silva et al., 2017, Jesus et al., 2015, Hayat et al., 2010).

Os sinais clínicos dos portadores de hipotireoidismo refletem o caráter multissistêmico da patologia, são sinais inespecíficos e de intensidade que pode variar de leve a grave. A sintomatologia frequentemente encontrada nos pacientes pode incluir: bradicardia, letargia, fraqueza, sonolência, sudorese, palidez da pele, perda de cabelo, palpitações, sensação de frio e diminuição da sudorese (Brenta et al., 2013, Garber et al., 2012). Além de predisposição a doenças cardíacas, obesidade e arterosclerose (Hayat et al, 2010; Natori, 1999). Estes sinais são reflexos do metabolismo reduzido e a gravidade dependerá do início da doença (Safer et al., 2013, Patel et al., 2013).

O atraso na cicatrização de feridas devido ao hipotireoidismo vem sendo relatado desde a década de 60, quando Kawaleswsk et al. (1967) avaliaram a cicatrização de ratos através da tireoidectomia e demonstraram que há a redução da síntese de colágeno causada pelo hipotireoidismo. Estes resultados estimularam os estudo seguintes que avaliaram se essa deficiência metabólica está associada apenas à fase de remodelação do processo cicatricial ou também aos estágio mais iniciais do processo (Safer et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que o hipotireoidismo interfere em diferentes estágios do reparo tecidual e o retardo em

uma fase pode interferir, sequencialmente, nas fases seguintes, o que compromete a efetividade da cicatrização (Paraguassu et al., 2014).

2.4 LASER

O Laser é uma forma de radiação eletromagnética não ionizante e acrônimo para: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. Apresenta propriedades únicas que o diferencia de outras fontes de luz, tais como monocromaticidade, coerência e colimação, sendo a base para as aplicações com finalidade terapêutica (Carrol & Humphreys, 2006).

A monocromaticidade é uma importante propriedade do laser, pois está relacionada à emissão de radiação em um único comprimento de onda direcionado a um fotorreceptor específico que absorve seletivamente diferentes comprimentos de onda. A coerência refere-se ao sincronismo entre as ondas propagadas durante a irradiação; significa que, as ondas de luz são na mesma fase em termos de tempo e espaço. E a colimação é o paralelismo dos feixes de luz emitido que permite a obtenção de alta densidade de energia em pequenos pontos (Tanzi, Lupton & Alster, 2003).

Pensava-se que a coerência fosse imprescindível para a ação do laser no tecido. Porém, Karu em 1983, após comparar o efeito entre fonte de luz coerente e incoerente sobre o crescimento celular, observou que o efeito estimulante na síntese do DNA ocorreu independente da coerência da luz utilizada, sugerindo que a coerência não é importante para o efeito fotobiológico do laser. Hoje, o uso do LED (Diodo emissor de luz), uma luz não coerente, tem sido utilizado nas pesquisas, principalmente devido ao seu baixo custo e fácil manuseio e tem demonstrado favorecer o fechamento da ferida e na reepitelização nos estágios iniciais do processo de reparo (Paraguassú et al., 2013).

Os primeiros efeitos biológicos da luz laser foram descobertos na década de 60 por Endre Mester. Desde então, e devido à multiplicidade de ações que o laser tem demonstrado, tem suscitado pesquisadores de todo o mundo a investir nas investigações dos benefícios do uso do laser como método de tratamento nas mais

variadas questões relacionadas à saúde. O laser apresentou atividade na diminuição da resposta inflamatória (Rabello et al., 2006), na neoformação de vasos (Gonçalves, et al, 2006), e no estímulo à proliferação fibroblástica (Mendez et al, 2004), promovendo a regeneração musculoesquelética (Shefer et al, 2001), nervosa (Moges et al., 2011) e a reparação óssea (Weber et al., 2006).

Os Lasers apresentam duas classificações, os de alta potência ou cirúrgicos e os de baixa potência, baixa intensidade ou terapêuticos (Coluzzi, 2004). Os primeiros são usados em tratamentos cirúrgicos, permitindo o corte, a vaporização e a coagulação dos tecidos. Os lasers de baixa potência atuam promovendo a analgesia, antiinflamação e a biomodulação.

A fototerapia a laser, anteriormente aplicada somente nas áreas médicas, vem despertando cada vez mais o interesse da Odontologia. Seu uso já vem sendo testado para aplicação nas diversas especialidades odontológicas, com o uso na prevenção e tratamento da mucosite (De Castro et al., 2013), no pós operatório de exodontias (Escobar et al., 2010), hipersensibilidade dentinária (kimura et al., 2000), prévio ao preparo cavitário (Tanboga et al., 2011), promovendo o reparo ósseo (Pires-Oliveira et al., 2010) e na aceleração do movimento ortodôntico (Cruz et al., 2004).

2.4.1. FOTOTERAPIA LASER

A incorporação da fototerapia a laser, também conhecida como laserterapia de baixa intensidade (LTBI) ou fotobiomodulação, como opção terapêutica tem sido amplamente difundida em inúmeras áreas biomédicas, principalmente com objetivo de modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de reparo tecidual (Uzêda e Silva et al., 2016; Santana et al., 2015; Usumeze et al., 2013).

A luz pode interagir com o tecido de quatro maneiras. A primeira é pela transmissão, quando ela passa pelo tecido, mas não causa nenhum efeito nele; a reflexão acontece quando a luz é refletida e não penetra no tecido; a dispersão é quando a luz é espalhada dentro do tecido e a quarta maneira é a absorção, mecanismo da fotobiomodulação, que é a absorção dos fótons emitidos pela luz

laser, promovendo, desta forma, um efeito sobre o tecido. Os componentes do tecido que absorvem os fótons dependem, preferencialmente, do comprimento de onda e são conhecidos como cromóforos (Carrol & Humphreys, 2006).

Considerando o espectro eletromagnético, os principais comprimentos de onda utilizados na laserterapia de baixa intensidade então nos comprimentos de onda vermelho (de 630 a 700nm) e infravermelho próximo (de 700 a 904nm) (Vladimirov, Osipov & Klebanov, 2004). Em geral, a profundidade de penetração da luz laser é maior com o aumento do comprimento de onda dentro do espectro de luz visível, tecidos mais superficiais são tratados com comprimentos de onda na gama de 600-700 nm, e tecidos mais profundos utilizam comprimentos de onda mais longos na gama de 780-950 nm (Chung et al., 2012, Mendez et al., 2004).

A principal razão para o uso das fontes de radiação nestes comprimentos de onda é o fato da hemoglobina não absorver neste espectro de luz e, portanto, a luz conseguir penetrar nos tecidos (Vladimirov, Osipov & Klebanov, 2003). O laser de baixa intensidade atua sem aquecer, e ao invés disso, após ser absorvido, ele induz reações fotoquímicas nas células através da biomodulação, agindo nos processos moleculares e bioquímicos que ocorrem normalmente nos tecidos (Lins et al., 2006).

Após a inserção do laser como uma modalidade terapêutica, surgiram os questionamentos sobre o seu mecanismo de ação tecidual. Nos estudos iniciais, os autores limitavam-se a descrever apenas toda a cadeia respiratória como fotorreceptor (Karu, 1989). Mas atualmente, sabe-se que a ação fotobiológica do laser ocorre através da ativação da cadeia respiratória da mitocôndria e que o citocromo c oxidase, uma enzima da cadeia terminal da cadeia respiratória mitocondrial, é a molécula com função receptora (Karu et al., 2005).

A excitação do fotorreceptor inicia uma cascata de atividades celulares, resultando assim na maior produção de ATP. Pequenas mudanças no nível de ATP podem alterar significativamente o metabolismo celular, com isso, aumentar a quantidade dessa energia pode promover a melhora no metabolismo celular, especialmente nas células que estejam comprometidas (Wong-Riley et al., 2005).

De acordo com Karu 1989, o efeito da ação bioestimuladora do laser na célula está na dependência do estado fisiológico da mesma antes da irradiação, isso pode

explicar o porquê do efeito da bioestimulação nem sempre ser possível. Neste caso, se uma célula se encontra em seu estado normal, não há estímulo para que o laser aja sobre ela com um efeito terapêutico. Entretanto, se uma célula está com déficit funcional, este é o estímulo para a ação do laser na tentativa de melhorar e normalizar a atividade celular.

Os efeitos na célula são bastante diversificados, pois a fotobiomodulação atua sobre diferentes tipos celulares. A interpretação dos resultados obtidos pelos pesquisadores, nos diferentes estudos, torna-se complicada, pois a diversidade de parâmetros utilizados como densidade de energia (dose), comprimentos de onda, potências e tempos de tratamento, algumas vezes, dificultam as comparações. (Posten et al., 2005).

Avaliando esta dificuldade em se comparar alguns dos parâmetros relatados na literatura, Jenkins & Carroll em 2011 sugerem parâmetros relacionados ao aparelho e ao tratamento que devem ser padronizados nos trabalhos com o mesmo propósito, a fim de permitir reproduções metodológicas e comparações dos resultados. Dentre os parâmetros mais importantes destacados pelos autores estão: comprimento de onda, potência, densidade de energia, parâmetros do pulso, área do feixe, tempo de irradiação, número de pontos irradiados, números de sessões e intervalo entre elas.

Ao longo dos anos, os estudos para avaliação da eficácia da irradiação laser vem sendo desenvolvidos em diversos modelos animais e em estudos *in vitro*. Embora as pesquisas de cultura de células possam ajudar a determinar o mecanismo de ação do LTBI, elas não podem reproduzir o complexo processo de cicatrização de feridas que ocorrem *in vivo*. Por isso modelos animais são os mais utilizados nos estudos para avaliação deste evento biológico, proporcionando assim uma simulação mais realista do efeito do laser sobre o tecido e, nestes casos, a relativa facilidade de trabalhar com os roedores os tornam o modelo de escolha para uso nas pesquisas científicas (Posten et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o padrão de reparo em feridas cutâneas excisionais dorsais de ratos hipotireoidianos e os efeitos da fototerapia laser (660 nm) com densidade de energia de 10J/cm² no processo de cicatrização tecidual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do hipotireoidismo e a influência da fototerapia Laser (λ660nm) no reparo tecidual em ratos, através da análise histológica da reepitelização, do processo inflamatório, da proliferação fibroblástica, da deposição colagênica e da neoangiogênese nos períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias.
- Verificar o efeito do hipotireoidismo e a influência da fototerapia Laser (λ660nm) na cicatrização tecidual em ratos, através da análise imunoistoquímica dos componentes da matriz extracelular, fibronectina, colágeno III e colágeno I, nos períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias.
- Verificar o efeito do hipotireoidismo e a influência da fototerapia Laser (λ660nm) na cicatrização tecidual em ratos, no perfil fibroblástico e miofibroblástico, através da análise da expressão imunoistoquímica do FSP1 e da α-SMA, respectivamente, nos períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias.

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Este experimento em animais seguiu os princípios éticos e legais de conduta de experimentação animal do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Instituição, protocolo nº 079/2015, de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2 AMOSTRA

Como modelo experimental desta pesquisa foram utilizados 72 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem Roedentia, da linhagem Wistar, machos, com peso inicial entre 200 e 250g obtidos da Suprilab – Suprimento de Laboratórios e Biotérios em Cachoeira/Ba

Os procedimentos e a manutenção dos ratos foram realizados no biotério de experimentação animal do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, em local livre de ruídos, com condições normais de umidade, temperatura média de 23°C e em ciclo de 12h de luz-escuridão. Cada gaiola foi forrada por maravalha, e substituída a cada 48 horas, propiciando, assim, condições favoráveis de higiene e preenchendo os requisitos físico-químicos para a saúde e bem-estar dos animais.

4.2.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: Eutireoidiano (E) e Hipotireoidiano (H). Ambos os grupos, foram divididos em 06 subgrupos, cada qual com 06 ratos/grupo, avaliados em 3 tempos biológicos pós-operatórios de acordo com a condição sistêmica, tempo experimental e protocolo de irradiação (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição dos ratos de acordo com a condição sistêmica, tempo experimental e protocolo de irradiação.

Grupos (n=6)	Protocolo de Irradiação	Período experimental (dias)
EC	EU Controle (sem irradiação)	3
EL	EU Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	3
HC	HIPO Controle (sem irradiação)	3
HL	HIPO Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	3
EC	EU Controle (sem irradiação)	7
EL	EU Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	7
HC	HIPO Controle (sem irradiação)	7
HL	HIPO Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	7
EC	EU Controle (sem irradiação)	14
EL	EU Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	14
HC	HIPO Controle (sem irradiação)	14
HL	HIPO Laser GaAIAs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 10J/cm ²)	14

4.3 TIREOIDECTOMIA

Para a indução do hipotireoidismo, foi realizada a retirada dos dois lobos da glândula tireoide, através de ato cirúrgico, 15 a 20 dias antes do experimento. Os ratos foram submetidos à anestesia geral, com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®) na posologia de 80mg/Kg e 14mg/Kg, respectivamente, e colocados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica. Após uma incisão longitudinal no pescoço, foram afastados a pele, tecido subcutâneo e glândulas salivares submandibulares, expondo os músculos esternomastóideo e esternohióideo. Esses músculos foram separados cuidadosamente na linha mediana para melhor exposição da traqueia e da glândula tireoide e foram mantidos retraídos com pequenos afastadores. Em seguida, foi seccionado o istmo da tireoide com o auxílio de duas pinças, e segurando firmemente o coto do istmo tireoidiano, cada lobo da tireoide foi dissecado por tração

com o auxílio de um cotonete. A dissecação foi realizada com cuidado para evitar lesão do nervo recorrente, que passa entre cada lobo tireoidiano e a traqueia (Fig. 2). A lesão desses nervos leva à morte do animal por asfixia. Após colocação dos músculos em posição, foi realizada a sutura da pele e aplicada, via intramuscular, 5.000 U.I. de penicilina e 10 mg de estreptomicina/100 g de peso corporal, uma única dose (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte – Fort Dodge).

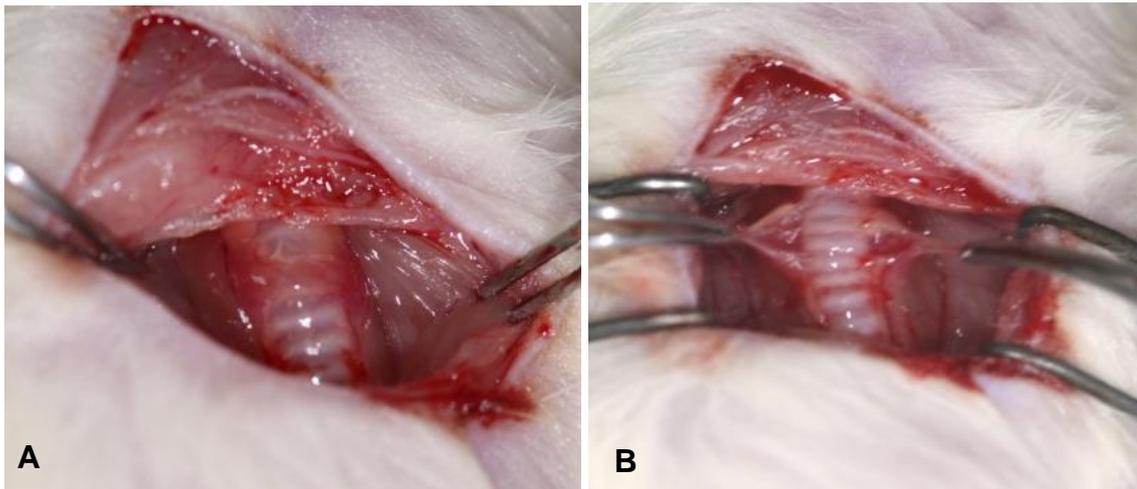


Figura 2 (A) Exposição da glândula tireoide, (B) Dissecação dos lobos da glândula tireoide.

Durante a tireoidectomia há um risco de lesão das paratireoides do animal, devido à íntima associação das glândulas paratireoides ao tecido tireoidiano e do seu tamanho extremamente pequeno. Porém, para evitar manifestação de hipoparatiroidismo, os ratos começaram a receber lactato de cálcio a 1% nos bebedouros, além do conteúdo de cálcio da ração utilizada também ser elevado, mantendo níveis normais de cálcio sérico.

Os animais do grupo eutireoidiano foram submetidos à anestesia e procedimentos cirúrgicos iniciais exatamente idênticos aos animais tireoidectomizados.

Para avaliar a eficácia da tireoidectomia, foram determinadas as concentrações plasmáticas de T_3 e T_4 no dia do experimento, e foi realizado o acompanhamento do crescimento corporal do animal.

Amostras de sangue do grupo eutireoidiano foram coletas nos mesmos períodos que os do grupo hipotireoidiano, para efeito comparativo quanto à normalidade dos níveis séricos deste hormônio entre os grupos.

4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL

O acompanhamento do peso corporal de cada rato foi realizado através de pesagens, 3 vezes por semana, durante todo o período experimental com o objetivo de avaliar e acompanhar a indução ao hipotireoidismo, devido às alterações de peso promovidas pela disfunção tireoidiana. Para isso foi utilizada uma balança digital (Filizola, MF-3) com capacidade máxima de 3000g e precisão de 0,5g.

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após o período de 21 dias de indução ao hipotireoidismo, os ratos foram submetidos à anestesia geral, com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®) na posologia de 80mg/Kg e 14mg/Kg, respectivamente. Em seguida, com os animais posicionados em decúbito ventral, foi realizada a tricotomia manual da região média do dorso e antissepsia da área cirúrgica com Digluconato de Clorexidina a 2%. Em todos os animais foram confeccionadas feridas cutâneas excisionais padronizadas de 1cm x 1cm com auxílio de um bisturi modificado com lâminas de bisturi nº 15 e um gabarito padronizado de 1cm x 1cm (Fig. 3). As feridas foram deixadas sem sutura para cicatrizar por segunda intenção.

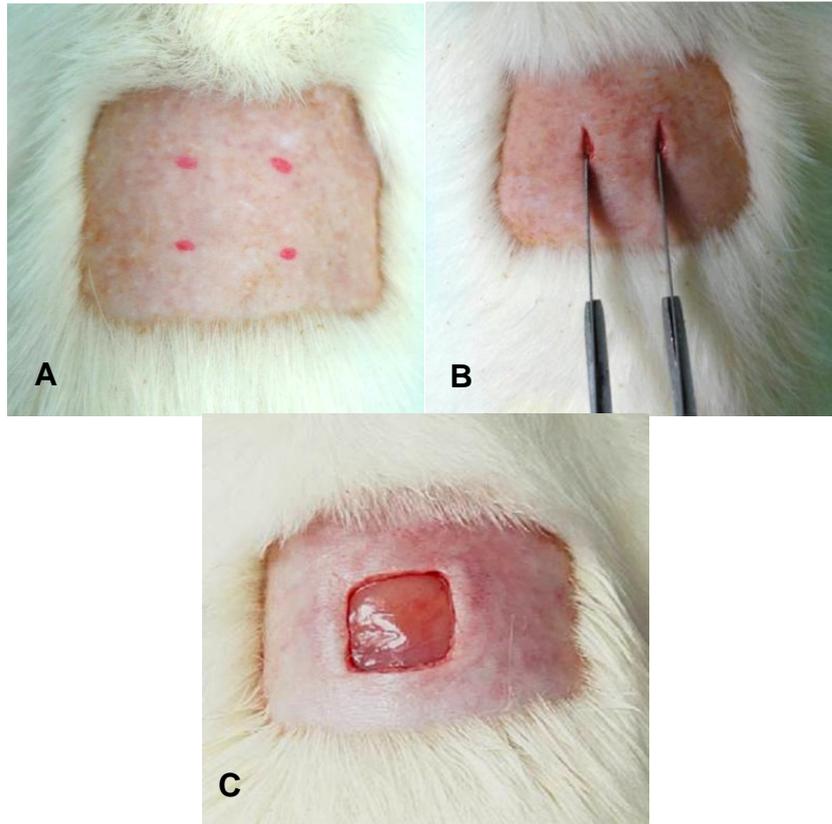


Figura 3 (A) Demarcação dos pontos correspondentes aos ângulos da ferida cirúrgica, (B) Incisão da ferida, (C) Ferida após confecção.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualmente em suas respectivas gaiolas plásticas, devidamente identificadas de acordo com o grupo ao qual fazia parte, e mantidos em constante observação até a finalização do período experimental.

4.6 IRRADIAÇÃO COM LASER

Para a irradiação dos grupos experimentais (E Laser e H Laser), foi utilizado o aparelho de Laser diodo AsGaAl, modelo *Twin Flex Evolution* (MMoptics®, São Carlos, SP), com emissão de radiação contínua (*Continuous Wave - CW*), no comprimento de onda vermelho ($\lambda 660\text{nm}$), potência de 40mW e área de saída do feixe da ponteira de $0,04\text{cm}^2$. O protocolo de irradiação por sessão consistiu na aplicação da densidade de energia de $10\text{J}/\text{cm}^2$, e foi iniciado imediatamente após a confecção da ferida excisional repetindo-as com intervalo de 48 horas, até a morte dos animais (3, 7 e 14 dias pós-operatório).

A irradiação com o laser foi realizada em contato, de forma pontual em quatro pontos correspondentes aos ângulos da ferida, o mais próximo de suas bordas, e em cada ponto foi depositada uma densidade de energia de $2,5\text{J}/\text{cm}^2$ com o tempo de aplicação de 62 segundos, totalizando $10\text{J}/\text{cm}^2$ e um tempo de aplicação total de 248 segundos por sessão (Fig. 4). A ponta do laser foi mantida em posição perpendicular ao tecido irradiado, a fim de garantir maior absorção da energia.



Figura 4 Irradiação com laser nos 4 ângulos da ferida.

Os parâmetros empregados nos protocolos de irradiação estão disponibilizados no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação

GRUPOS PARÂMETROS	EUTIREOIDIANO E HIPOTIREOIDIANO CONTROLE			EUTIREOIDIANO E HIPOTIREOIDIANO LASER		
	3 dias	7 dias	14 dias	3 dias	7 dias	14 dias
Comprimento de onda (nm)	-	-	-	660nm	660nm	660nm
SAEF (J/cm ² - sessão)	-	-	-	10J/cm ²	10J/cm ²	10J/cm ²
SAEF (J/cm ² - tratamento)	-	-	-	20J/cm ²	40J/cm ²	70J/cm ²
Potência Output (mW)	-	-	-	40mW	40mW	40mW
Área do tecido iluminada (cm ²)	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²
Área do Spot (cm ²)	-	-	-	0,04cm ²	0,04cm ²	0,04cm ²
Irradiância (mW/cm ²)	-	-	-	1000mW/cm ²	1000mW/cm ²	1000mW/cm ²
Tempo de irradiação (sessão)	-	-	-	248s	248s	248s
Tempo de irradiação (tratamento)	-	-	-	496s	992s	1736s

4.7 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Ao final do período experimental para cada grupo (3, 7 ou 14 dias), os ratos foram submetidos à sobrecarga anestésica por Tiopental, através da via jugular. Constatada a morte dos mesmos, a partir da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, as peças foram removidas através de uma excisão realizada ao redor da ferida com margem de tecido de 1cm x 1cm, e acondicionadas em frascos plásticos devidamente identificados contendo formol a 10%, com volume aproximadamente igual a cinco vezes o volume da peça, onde permaneceram por 24h para sua fixação. Em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), onde foram processadas.

4.8 ESTUDO MORFOLÓGICO

Após o período de fixação, as peças foram submetidas ao processamento pela técnica histológica de rotina e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 4 μ m, sendo uma parte destinada à coloração histológica com Hematoxilina e Eosina (HE). A avaliação histológica foi realizada sob microscopia de luz (AxioStar®, Zeiss, Germany) em estudo cego por um patologista experiente, de forma semiquantitativa, de acordo com os critérios encontrados no Quadro 2.

Quadro 2: Critérios utilizados na análise histológica.

Variáveis	Scores		
Reepitelização	Ausente Reepitelização ausente	Incompleta Reepitelização recobrimdo <50% ou >50% da ferida	Completa Reepitelização recobrimdo 100% da ferida com espessura regular ou irregular
Inflamação Aguda	Discreta Presença de até 25% de neutrófilos na área	Moderada Presença de 25 a 50% de neutrófilos na área	Intensa Presença superior a 50% de neutrófilos na área
Inflamação Crônica	Discreta Presença de até 25% de células inflamatórias crônicas na área	Moderada Presença de 25 a 50% de células inflamatórias crônicas na área	Intensa Presença superior a 50% de células inflamatórias crônicas na área
Angiogênese	Discreta Quantidade de vasos sanguíneos inferior ao tecido adjacente normal	Moderada Quantidade de vasos sanguíneos similar ao tecido adjacente normal	Intensa Quantidade de vasos sanguíneos superior ao tecido adjacente normal
Fibroblastos	Discreta Presença de até 25% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.	Moderada Presença de 25 a 50% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.	Intensa Presença superior a 50% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.
Deposição de colágeno	Discreta Presença de até 25% de deposição de fibras colágenas na área	Moderada Presença de 25 a 50% de deposição de fibras colágenas na área	Intensa Presença superior a 50% de deposição de fibras colágenas na área

4.9 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.9.1 Técnica Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada em cortes de 3µm de espessura obtidos dos espécimes fixados em formol e incluídas em parafina. Foi utilizado o método da imunoperoxidase e sistema de detecção EnVision (Dako) para os anticorpos primários Anti-colágeno I, Anti-colágeno III. A tecnologia ADVANCE HRP (Dako) para os anticorpos primários Anti-Fibronectina, anti-SMA, anti-S100A4 (FSP1). A padronização encontra-se na tabela 2. As etapas laboratoriais são descritas a seguir:

- Desparafinização: 3 banhos em xilol (1,2 e 3) – 5 min cada;
- Reidratação: 2 banhos em álcool absoluto (100% - 1 e 2), 1 em álcool 95% (3) e 1 em álcool 70% (4) – 3min cada;
- Lavagem: solução tampão TRIS HCL pH 6,8 - 2 vezes por 5 min;
- Bloqueio da Peroxidase Endógena: Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, (10 min cada);
- Lavagem: solução tampão TRIS HCL pH 6,8 - 2 vezes por 5 min;
- Recuperação Antigênica:
 - Incubação em tampão citrato-fosfato – pH 6,0 a 96°C (banho-maria), por 20 min; para os anticorpos Fibronectina, SMA, S100A4;
- Resfriamento: 20 min, temperatura ambiente;
- Lavagem: solução tampão TRIS HCL pH 6,8 - 2 vezes por 5 min;
- Bloqueio de biotina endógena: leite mólico 4% por 10 min para os anticorpos anti-col III e anti-col I;
- Incubação Anticorpo Primário: diluídos em diluente (S3022, Dako) por:
 - 18h (overnight) a 4°C para os anticorpos anti-Fibronectina, anti-SMA, anti-S100A4;
 - 60 min a 37°C para os anticorpos anti-col III e anti-col I;
- Lavagem: solução tampão TRIS HCL pH 6,8 - 2 vezes por 5 min;
- Sistema de Detecção:
 - EnVision™ Dual Link System HRP (K406189, Dako) para COL III e COL I, uma etapa 30 min.

• ADVANCE HRP (K4069, Dako) para Fibronectina, SMA, S100A4, ambos em duas etapas 30 min cada;

- Lavagem: solução tampão TRIS HCL pH 6,8 - 2 vezes por 5 min;
- Cromógeno: kit DAB (Dako, K3468) 5-10min;
- Água destilada (paralização reação do DAB);
- Contra-Coloração:
 - Hematoxilina de Harris;
 - Lavagem em água corrente por 10 min;
 - Álcool 70% por 2 min;
 - Álcool 1 por 2 min;
 - Álcool 2 por 2 min;
 - Álcool 3 por 2 min;
 - Xilol 1 por 3 min;
 - Xilol 2 por 3 min;
 - Xilol 3 por 3 min;

Os procedimentos de controle envolveram a utilização de amostra com reatividade conhecidamente positiva para cada anticorpo, funcionando como controle externo positivo da reação (Tabela 2). Como controle negativo, foi utilizado o mesmo tecido, onde o anticorpo primário foi substituído por soro, devendo a reação ser completamente negativa.

Tabela 2 Especificações dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo
Fibronectina	Abcam	ab23751	1:700	Citrato pH 6,0	Pele
Colágeno I	Abcam	ab90395	1: 100	Tripsina	Pele
Colágeno III	Abcam	ab6310	1:100	Tripsina	Pele
α-SMA	Dako	A14	1:250	Citrato pH 6,0	Pele
S100A4	Abcam	Ab197896	1:2500	Tris EDTA	CEC

4.9.2 Análise imunoistoquímica

A avaliação imunoistoquímica foi realizada sob microscopia de luz (AxioStar®, Zeiss, Germany) em estudo cego por um patologista experiente, de forma semiquantitativa, de acordo com a intensidade da imunomarcção da fibronectina, colágeno I e colágeno III, sendo classificadas de acordo com os critérios encontrados no Quadro 3. A avaliação da expressão foi realizada com objetiva de aumento de 200x.

Para o anticorpo α -SMA e FSP1 foram selecionados 5 campos das áreas mais representativas. As células foram contadas em um aumento de 400x (Santana et al., 2015). Os resultados foram expressos em percentagem de área positiva (hot spot) em relação à área total do campo avaliado. Os vasos foram evitados durante a análise do α -SMA.

Quadro 3: Critérios utilizados na análise imunoistoquímica (Adaptado de Paraguassu et al., 2014 e Sousa et al., 2014)

Anticorpo	Scores		
Anti Colágeno I	Discreto (+) Imunomarcção do colágeno I é menos intensa que o observado no tecido normal adjacente.	Moderado (++) Imunomarcção do colágeno I é similar ao observado no tecido normal adjacente.	Intenso (+++) Imunomarcção do colágeno I é mais intensa que o observado no tecido normal adjacente.
Anti Colágeno III	Discreto Imunomarcção do colágeno III é menos intensa que o observado no tecido normal adjacente.	Moderado Imunomarcção do colágeno III é similar ao observado no tecido normal adjacente.	Intenso Imunomarcção do colágeno III é mais intensa que o observado no tecido normal adjacente.
Anti fibronectina	Discreto Preenchimento da ferida < 25%	Moderado Preenchimento da ferida entre 25 a 50%	Intenso Preenchimento da ferida > 50%

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel e analisados estatisticamente com auxílio do programa Minitab®. Para a comparação intra e intergrupo das análises semiquantitativas foi utilizado o teste não paramétrico Exato de Fisher. Para as avaliações quantitativas foram utilizados os testes paramétricos ANOVA e para avaliação do peso corporal foi utilizado o teste T de Student. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E PONDERAL

O hipotireoidismo foi confirmado pela redução na concentração plasmática de T3 e T4. Os níveis hormonais de T3 foram significativamente mais baixo nos ratos Hipotireoidianos ($< 1.00 \mu\text{g/dl}$; $p \leq 0.01$) quando comparado aos ratos Eutireoidiano ($0.6 \mu\text{g/dl}$ $p \leq 0.01$), e de T4 nos ratos Hipotireoidianos ($< 0.25 \mu\text{g/dl}$; $p \leq 0.01$) quando comparados aos ratos Eutireoidiano ($3.5 \mu\text{g/dl}$).

Na avaliação ponderal foi observada diminuição no ganho do peso corporal no grupo hipotireoidiano em relação ao grupo eutireoidiano ($p < 0,001$). Após 1 semana da realização da tireoidectomia pode-se observar diminuição no ganho do peso corporal dos ratos hipotireoidianos que foi decrescendo com o passar das semanas. Os ratos eutireoidianos ganharam peso em relação ao peso corporal inicial. A evolução do peso corporal ao longo das semanas de experimento pode ser observada na Figura 5.

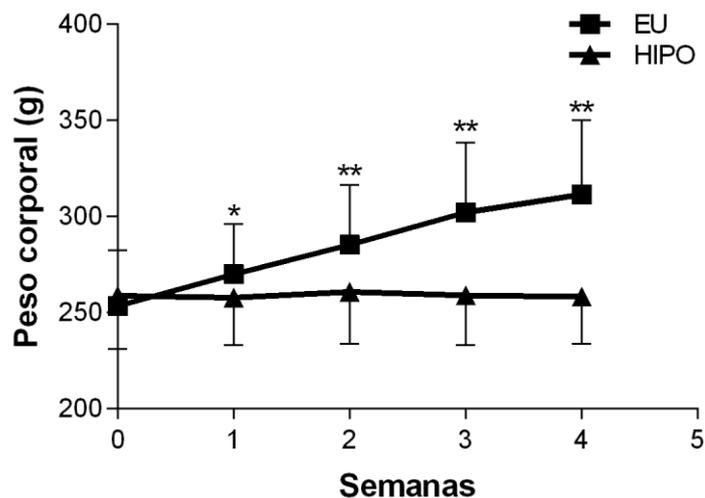


Figura 5 - Evolução do peso corporal nos grupo eutireoidiano (■) e hipotireoidiano (▲). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. Comparação entre os grupos Eu e Hipo foram estatisticamente significantes ($p=0,001$) (Teste t de Student).

5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Os resultados foram obtidos por meio da microscopia de luz, para todos os grupos experimentais, como descrito anteriormente.

5.2.1 ANÁLISE DESCRITIVA

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 3 DIAS

GRUPO EUTIREOIDIANO

Aos três dias após a lesão, observou-se reepitelização inicial em 50% dos casos do grupo EC, enquanto no grupo EL observou-se migração inicial de queratinócitos em 66,6% dos casos. Embora a inflamação aguda tenha sido observada mais discretamente (66,6%) no grupo EC, ainda havia persistência de polimorfonucleares em grau intenso dos casos (16,7%). Já no grupo EL, o infiltrado inflamatório agudo predominou discretamente (83,3%). Em relação ao infiltrado inflamatório crônico, em ambos os grupos, a maioria apresentava-se moderado, EC (50%) e EL (66,6%). Discreta angiogênese foi observada entre os grupos. Em relação à proliferação fibrocelular, observou-se discreta presença de fibroblastos no grupo EC, já no grupo EL pode-se observar proliferação mais aumentada deste tipo celular, estando moderado em 50% dos casos. Rara deposição de colágeno foi observada em ambos os grupos.

GRUPO HIPOTIREOIDIANO

Aos três dias após a lesão, observou-se destruição tecidual e ausência de reepitelização em 50% dos casos do grupo HC, enquanto no grupo HL a migração inicial dos ceratinócitos predominou em 100% das amostras. A inflamação aguda mostrou-se mais discreta no grupo HL (83,3%) quando comparado com o grupo HC que apresentou 1 caso com população de polimorfonucleares em maior destaque

que no restante, também pode-se observar áreas de edema. O infiltrado inflamatório crônico variou de discreto (50%) a moderado (50%) em ambos os grupos. Discreta angiogênese foi observada nos grupos HC e HL. Em relação à proliferação fibroblástica, também foi observada similaridade entre os grupos e a presença discreta destas células. A deposição de colágeno foi escassa em ambos os grupos.

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 7 DIAS

GRUPO EUTIREOIDIANO

Aos sete dias após a confecção da ferida, o grupo EC mostrou presença de ferida cutânea com reepitelização moderada ocupando uma área inferior a 50% da área da ferida em todas as amostras. A repavimentação no grupo EL foi similar ao grupo controle. Na derme, observou-se sinais de inflamação, com infiltração discreta de polimorfonucleares no grupo EC (100%) e moderada de monocucleares (83,3%). Já no grupo EL o infiltrado inflamatório agudo foi considerado discreto em 66,6% dos casos e o infiltrado inflamatório crônico foi discreto em todos os casos. Observou-se angiogênese predominantemente moderada no grupo EC (83,3%), no grupo EL a angiogênese variou de discreta, moderada e intensa (50%). A reação fibrocelular foi caracterizada por proliferação fibroblástica predominantemente moderada (83,3%) no grupo EC. No grupo EL os fibroblastos variou de moderada a intensa (50%). A deposição de colágeno no grupo EC foi discreta em 50% dos casos e moderada na outra metade. No grupo EL houve maior deposição de fibras colágenas (66,6%).

GRUPO HIPOTIREOIDIANO

Sete dias após a lesão, observou-se ferida cutânea com repavimentação epitelial discreta e inferior a 50% da área da ferida em ambos os grupos. O infiltrado inflamatório agudo foi discreto em todos os casos do grupo controle e em 83,3% do grupo HL. Enquanto o infiltrado crônico foi predominantemente intenso (83,3%) no grupo HC quando comparado com o grupo irradiado. A angiogênese apresentou maior intensidade no grupo HL (50%) e apresentou-se moderada na metade do

grupo HC. Houve uma distribuição similar em relação à quantidade de fibroblastos no grupo HC e estes foram observados de discreta a intensamente (33,3%). No grupo HL foi observada maior proliferação fibrocelular em comparação ao grupo controle. A deposição colagênica foi intensamente maior no grupo HL (50%) quando comparada à deposição moderada no do grupo HC (50%).

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 14 DIAS

GRUPO EUTIREOIDIANO

Aos 14 dias, o grupo EC mostrou recobrimento total da ferida em 83,3% dos casos, em apenas 1 dos casos foi observada reepitelização moderada 66,6%recobrimdo quase toda a área da ferida. No grupo EL foi observada reepitelização completa em 66,6% das amostras, os 33,3% restantes apresentou recobrimento de mais da metade da área da ferida. Quanto à presença do infiltrado inflamatório, observou-se infiltrado constituído principalmente de mononucleares presentes discretamente (66,6%) em ambos os grupos. Já o infiltrado inflamatório agudo apresentou-se discreto em todos os casos independente do grupo. A neovascularização foi mais moderada (66,6%) no grupo EC em comparação com o grupo EL que demonstrou ser predominantemente discreta (83,3%). Intensa proliferação fibroblástica pode ser observada em ambos os grupos EC (66,6%) e EL (83,3%). Da mesma forma, observou-se intensa deposição colagênica entre os grupos.

GRUPO HIPOTIREOIDIANO

Aos 14 dias após a lesão, em ambos os grupos, a reepitelização predominou moderada, não ocorrendo o fechamento completo da ferida. A inflamação aguda apresentou-se discreta e menor em todos os casos do grupo irradiado, já que ainda pode-se observar em alguns casos do grupo HC a presença moderada de neutrófilos. O infiltrado inflamatório crônico foi predominantemente discreto no grupo

HC (83,3%), e variou de discreto a moderado (50%) no grupo HL, com a maior presença de células linfocitárias. Discreta angiogênese estava presente em ambos os grupos HC e HL (66,6%). A quantidade de fibroblastos e a deposição colagênica variaram de moderada a intensa (50%) no grupo HC. Já no grupo HL observou-se maior expressividade em 66,6% dos casos e a deposição de colágeno também foi intensa na maioria dos casos (83,3%).

5.2.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 3 DIAS

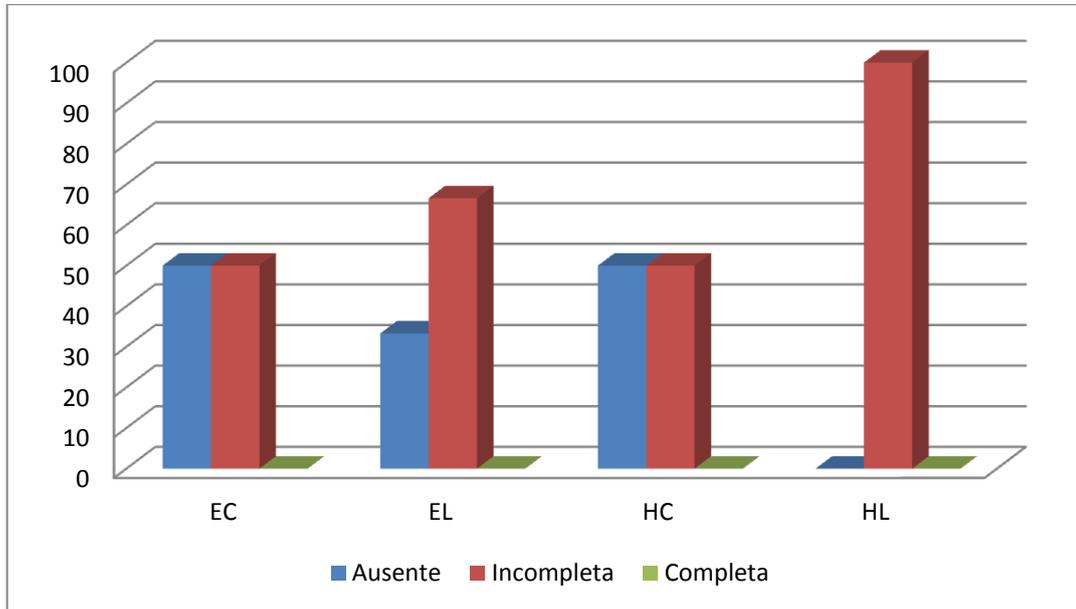
No grupo eutireoidiano, em relação à variável reepitelização, a análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos EC e EL. No grupo hipotireoidiano, o grupo irradiado apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p=0,046$) (Figura 6). Quando os grupos eutireoidianos foram confrontados com os respectivos grupos hipotireoidianos, observou-se que mantiveram graus similares de reepitelização, sem diferença estatisticamente significativa.

Na avaliação do tipo de infiltrado inflamatório, angiogênese e deposição de colágeno, não houve diferença estatisticamente significativa quando as avaliações intra e intergrupo foram realizadas.

A análise estatística em relação à proliferação fibroblástica revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos EL e HL, onde houve maior proliferação celular no grupo EL ($p=0,046$) (Figura 7).

Figura 6 - Reepitelização da ferida. 1. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à reepitelização 2. Fotomicrografia representativa do início da reepitelização no 3º dia após a confecção da ferida no grupo hipotireoidianos laser (A) e hipotireoidiano controle (B). Objetiva de 100x. ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).

1



2

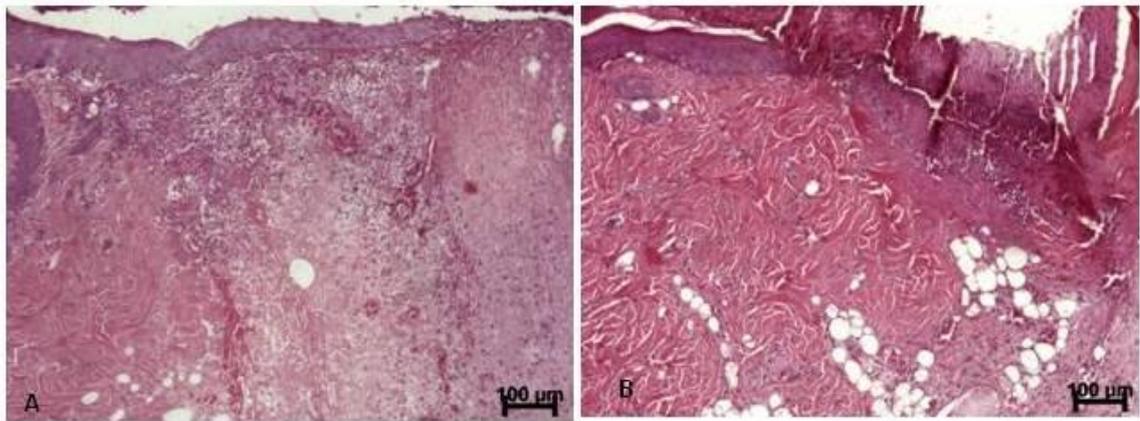
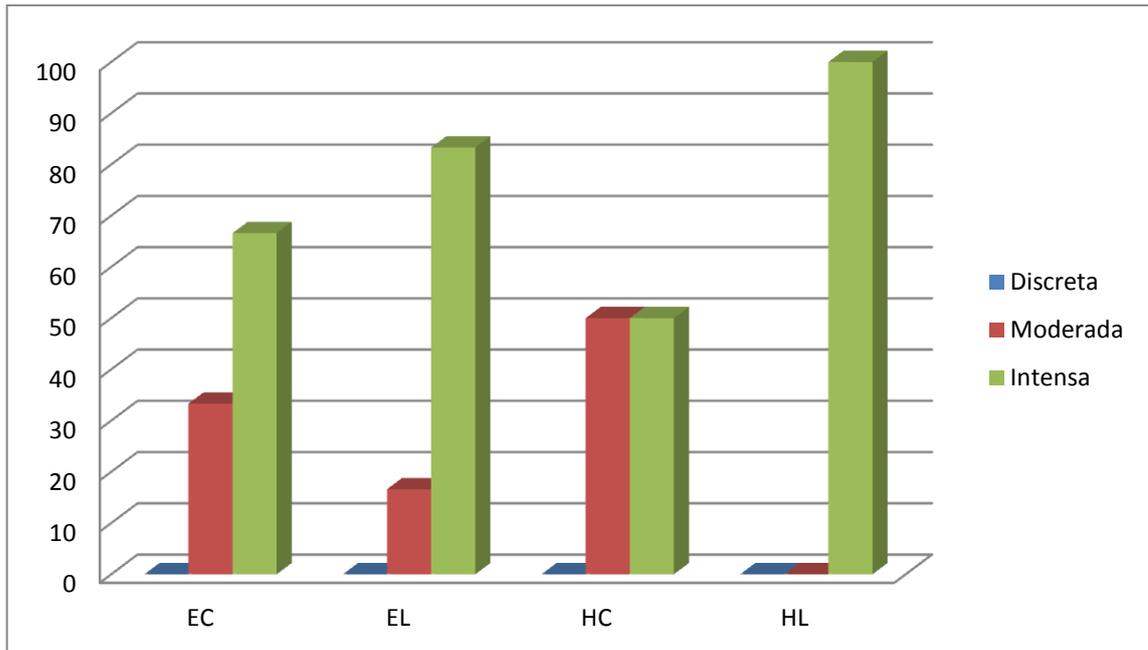


Figura 7 - Comparação entre os grupos Eutireoidiano e Hipotireoidiano Laser avaliados em relação à proliferação fibroblástica ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).

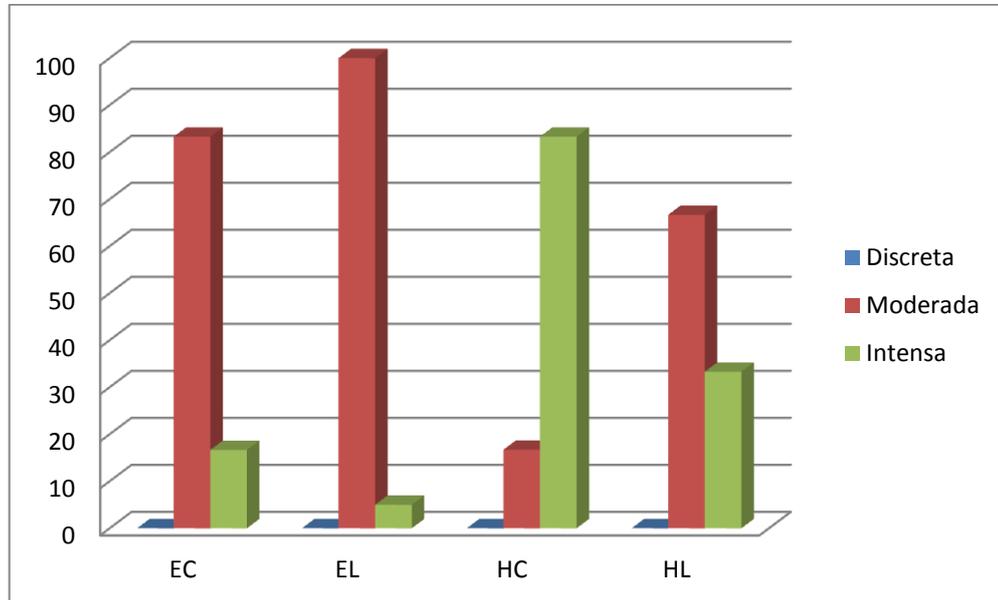


GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 7 DIAS

Em relação à variável reepitelização, a análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa intra e intergrupos, pois todos os casos apresentaram reepitelização incompleta ($p > 0,05$).

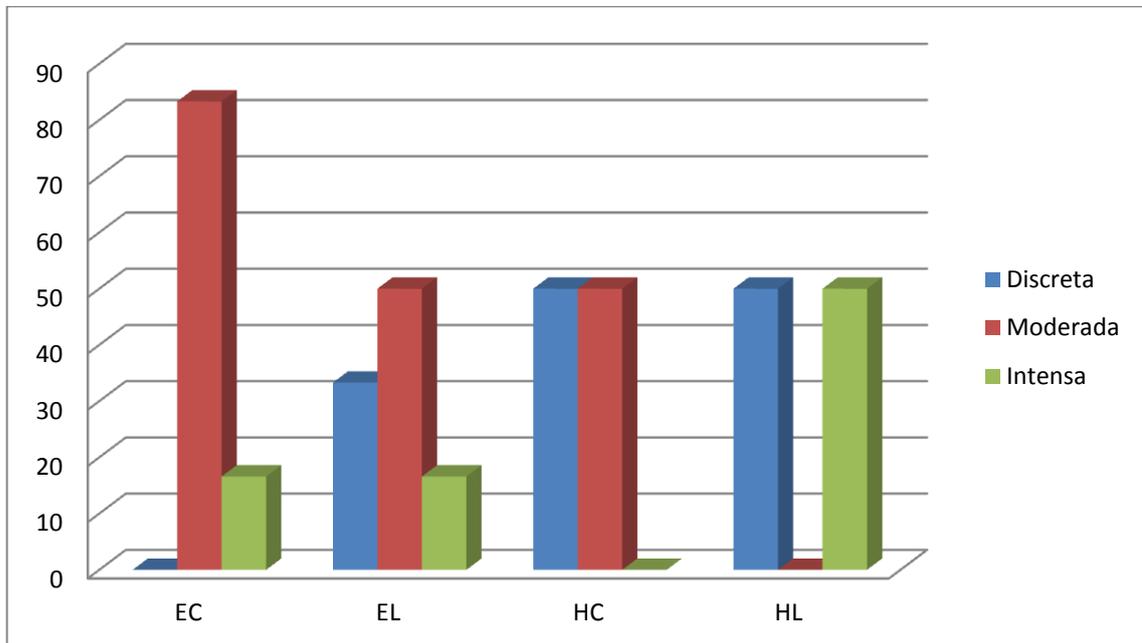
Quando o tipo de infiltrado inflamatório foi avaliado, observou-se inflamação crônica significativamente mais intensa no grupo hipotireoidiano controle quando comparado ao grupo irradiado ($p = 0,015$) (Figura 8). Na avaliação intergrupo o grupo HC também diferiu estatisticamente do grupo EC ($p = 0,015$) (Figura 8) apresentando maior grau na intensidade do infiltrado crônico. A análise estatística do infiltrado agudo não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Figura 8 - Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidiano avaliados em relação ao infiltrado inflamatório (HC x HL, $p=0,007$ EC x HC, $p=0,015$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).



Na análise da angiogênese, diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando o grupo hipotireoidiano foi comparado. A análise revelou que o grupo irradiado HL apresentou maior neovascularização que o grupo controle ($p=0,046$) (Figura 9) Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo eutireoidiano ou na avaliação intergrupo.

Figura 9 - Comparação entre os grupos Hipotireoidiano controle e Laser avaliados em relação à angiogênese ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).

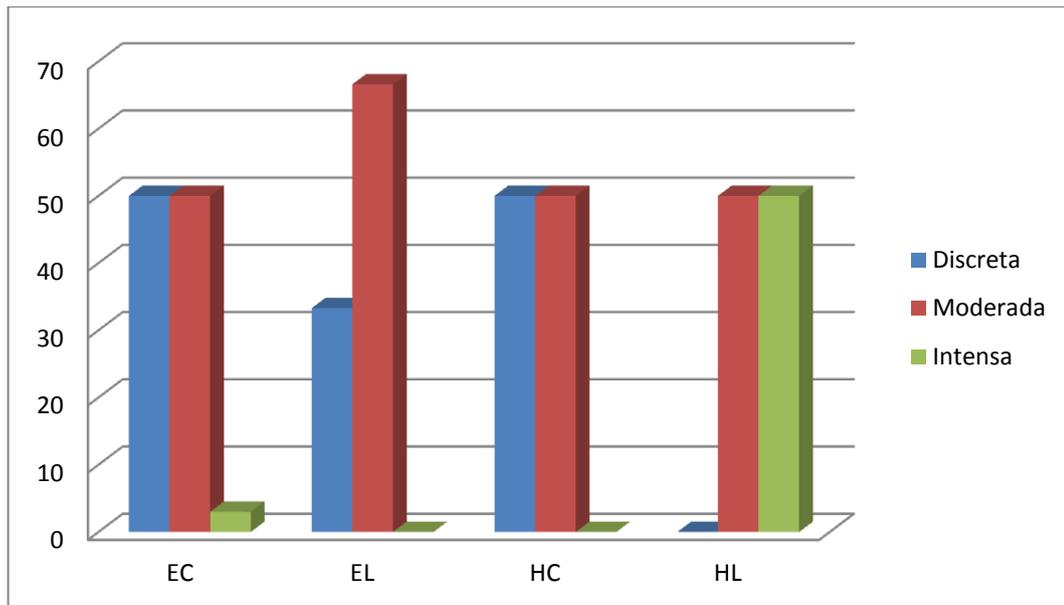


Quando a variável proliferação fibroblástica foi analisada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

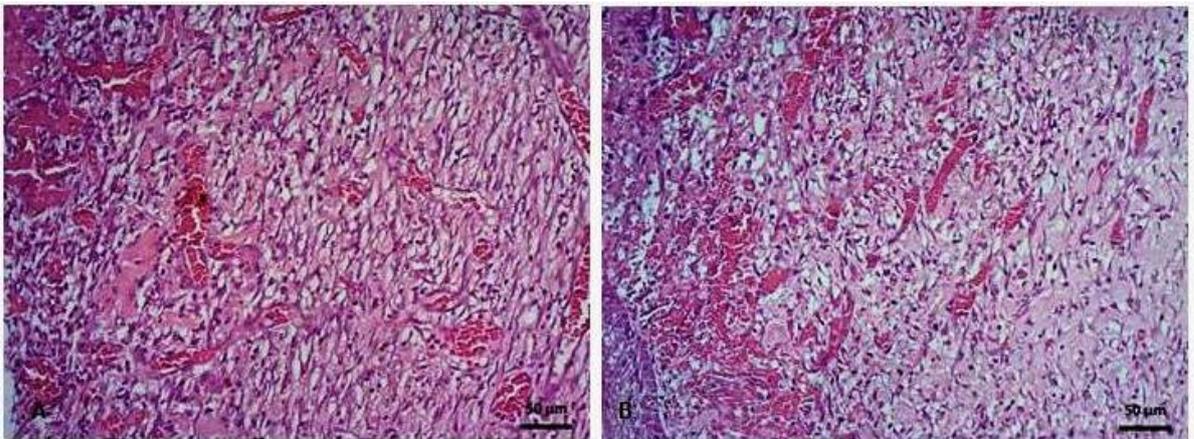
A análise da variável deposição de fibras colágenas revelou que os grupos hipotireoidianos diferiram estatisticamente, o grupo HL apresentou maior deposição de colágeno que o grupo HC ($p=0.046$) (Figura 10). Os grupos eutireoidianos não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Quando a avaliação foi realizada intergrupo, a análise não demonstrou diferença estatisticamente significativa

Figura 10 - Deposição de colágeno. 1. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à deposição de colágeno 2. Fotomicrografia representativa da deposição discreta no grupo hipotireoidiano controle (A) e moderada no grupo hipotireoidiano controle (B) no 7º dia. Objetiva de 200x. ($p=0,046$ Teste Exato de Fisher) (UFBA, 2018).

1



2

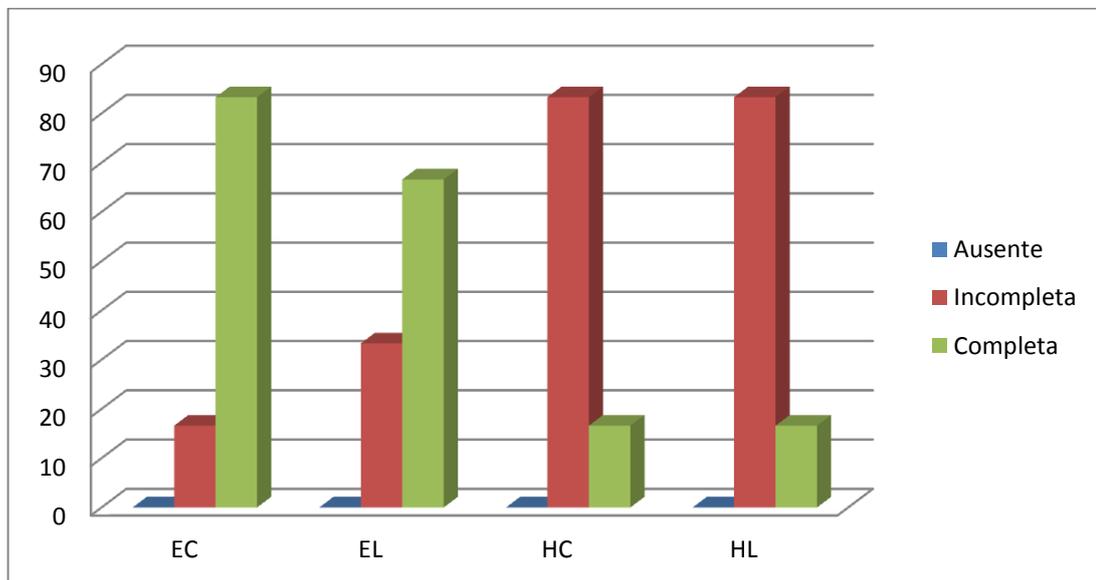


GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 14 DIAS

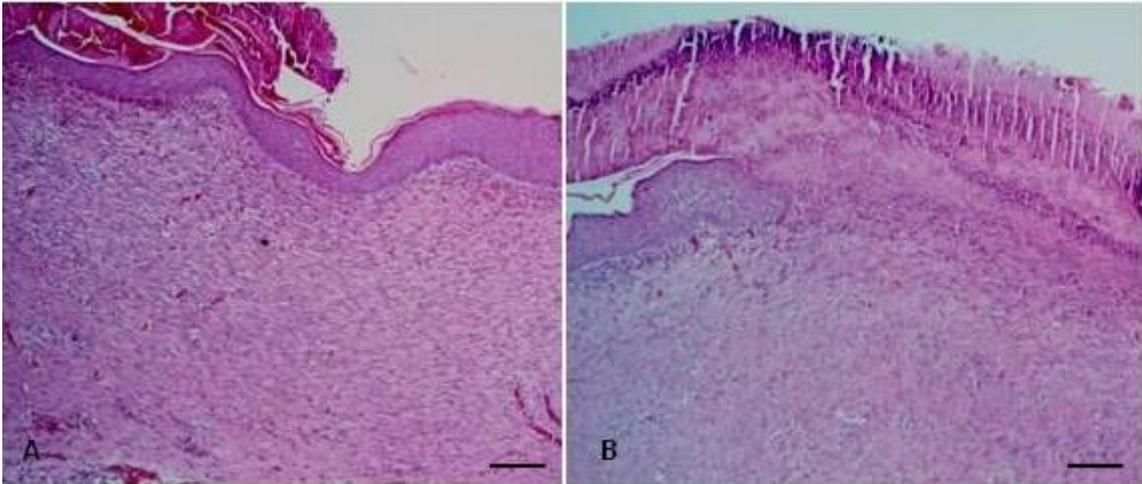
Quando a análise estatística foi aplicada aos grupos em 14 dias, diferença estatisticamente significativa foi observada quando a variável reepitelização foi analisada. O grupo EC apresentou reepitelização mais completa quando comparada com o grupo HC ($p=0,036$). Da mesma forma, quando os grupos irradiados foram confrontados, maior reepitelização reepitelização foi observada no grupo EL quando comparada ao grupo HL ($p=0,036$) (Figura 11).

Figura 11 - Reepitelização da ferida. 1. Comparação entre os grupos Hipotireoidiano e Eutireoidianos avaliados em relação à reepitelização 2. Fotomicrografia representativa do 14º dia após a confecção da ferida demonstrando reepitelização completa no grupo hipotireoidianos laser (A) e reepitelização incompleta no grupo hipotireoidiano controle (B). Objetiva de 100x. ($p=0,046$ Teste exato de Fisher) (UFBA, 2018).

1



2



Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nas variáveis infiltrado inflamatório, sejam nas avaliações intra e intergrupo ($p > 0,05$). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente em relação à angiogênese, proliferação fibroblástica e deposição de colágeno.

5.3 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

5.3.1 IMUNOMARCAÇÃO FIBRONECTINA, COLÁGENO TIPO I e III

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 3 DIAS

Aos três dias, foi possível visualizar a imunomarcação do colágeno tipo I, tipo III e da fibronectina em todas as amostras avaliadas. Nos grupos eutireoidianos EC e EL, a imunoposição do colágeno tipo I foi predominantemente moderada (100%, 66,7% respectivamente). Enquanto que a imunoposição do colágeno III foi discreta em 50% dos casos do grupo EC e moderada em 66,7% dos casos do grupo EL. A imunoposição da fibronectina foi intensa em 66,7% no grupo EC e em 100% dos casos do grupo EL.

No grupo HC, a imunoposição do colágeno I foi discreta em 66,7% dos casos e moderada em 100% dos casos do grupo HL. Já a imunoposição do

colágeno III foi intensa em 66,7% dos casos do grupo HC e intensa em todos os casos do grupo HL. Na avaliação da imunexpressão da fibronectina, observou-se intensa em 100% no grupo controle e em 83,3% dos casos irradiados.

A análise estatística não demonstrou diferença na imunexpressão do colágeno tipo I no grupo eutireoidiano, mas demonstrou diferença estatística no grupo HL quando comparado ao grupo não irradiado HC ($p=0,021$). Quando os grupos EC e EL foram comparados, respectivamente, aos grupos HC e HL, houve diferença estatisticamente significativa apenas quando os grupos controles foram comparados ($p=0,02$).

A análise estatística do colágeno tipo III foi significativamente mais intensa no grupo HC em comparação com o grupo EC ($p=0,01$). O grupo HL também apresentou maior imunexpressão do colágeno III em relação ao grupo HC ($p=0,01$).

A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando os grupos eutireoidianos, irradiados ou não, foram comparados. Da mesma forma, nos grupos hipotireoidianos não houve diferença estatística, embora no grupo irradiado foi observado maior imunexpressão quando comparado ao grupo controle.

Na análise estatística da fibronectina, nenhuma diferença estatística foi encontrada neste período.

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 7 DIAS

Aos 7 dias, o colágeno tipo I foi marcado em todas as amostras dos dois grupos, já o colágeno tipo III não foi expresso em algumas amostras avaliadas. Já a fibronectina não foi marcada em alguns casos dos grupos irradiados. Nos grupos eutireoidianos, a imunexpressão de colágeno I variou de discreta (50%) a moderada (50%) no grupo EC. No grupo EL, a imunexpressão variou de discreta (33,3%), moderada (50%) e intensa (16,7%). Na imunexpressão do colágeno III, houve uma distribuição homogênea na imunomarcagem do grupo EC, variando de discreta (33,3%), moderada (33,3%) e intensa (33,3%), já no grupo EL, predominou a imunexpressão moderada (50%). Na avaliação da fibronectina neste período, o grupo eutireoidiano apresentou uma distribuição variando de discreta (50%),

moderada (33,3%) e intensa (16,7%), mostrando uma menor imunexpressão da fibronectina. O grupo irradiado também apresentou a tendência na diminuição da expressão da fibronectina, variando de discreta (33,3%), moderada (16,7%) e intensa (50%).

No grupo hipotireoidiano, a imunexpressão do colágeno tipo I foi maior no grupo irradiado em comparação ao grupo não irradiado, e apresentaram imunexpressão predominantemente intensa (50%) e discreta (83,3%), respectivamente. O contrário foi observado em relação a imunexpressão do colágeno III no grupo HC que predominou discreta (83,3%). No grupo irradiado, a imunomarcagem do colágeno III variou entre discreta (16,7%), moderada (50%) e intensa (33,3%). O grupo hipotireoidiano manteve imunexpressão intensa em na marcação da fibronectina em 83,3% dos casos, e o grupo irradiado apresentou uma diminuição na imunexpressão da fibronectina e apresentou 66,7% das amostras com padrão moderado de imunexpressão.

A análise estatística do colágeno I, colágeno III e fibronectina não demonstrou diferença estatística entre os grupos avaliados.

GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 14 DIAS

Aos 14 dias, o colágeno tipo I manteve-se expresso em todas as amostras, já o colágeno tipo III não foi expresso na maioria das amostras avaliadas, principalmente nos grupos eutireoidianos e no grupo hipotireoidiano irradiado. Na imunexpressão do colágeno I foi moderada em todos os casos do grupo EC, e variou de moderada (66,7%) a intensa (33,3%) no grupo EL. A imunexpressão do colágeno III foi discreta na maioria dos casos (66,7%), tanto no grupo controle quanto no grupo irradiado. Já a imunexpressão da fibronectina, esta predominou discreta (66,7%) no grupo EC. O mesmo padrão pode ser observado no grupo irradiado.

No grupo hipotireoidiano, a imunexpressão do colágeno I foi menor no grupo HC em comparação ao grupo HL, sendo discreta (50%) no grupo HC e intensa (50%) no grupo HL. Na comparação do colágeno III, houve maior imunexpressão

no grupo HC, variando de discreta (16,7%), moderada (33,3%) a intensa (50%) que no grupo HL, que variou de discreta (66,7%) a moderada (33,3%). Observou-se que a fibronectina no grupo HC predominou moderada em 66,7% dos casos, enquanto no grupo irradiado variou de discreta a intensa, mas com predominância da imunoexpressão moderada (50%).

A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($P > 0,05$).

Durante a análise da dinâmica da deposição da MEC, comparando os resultados com 3, 7 e 14 dias de experimento, observou-se que houve redução da expressão de fibronectina e colágeno tipo III e aumento do colágeno tipo I.

Os aspectos da expressão imunoistoquímica da fibronectina, colágeno I e colágeno III estão apresentados nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente.

Colágeno I

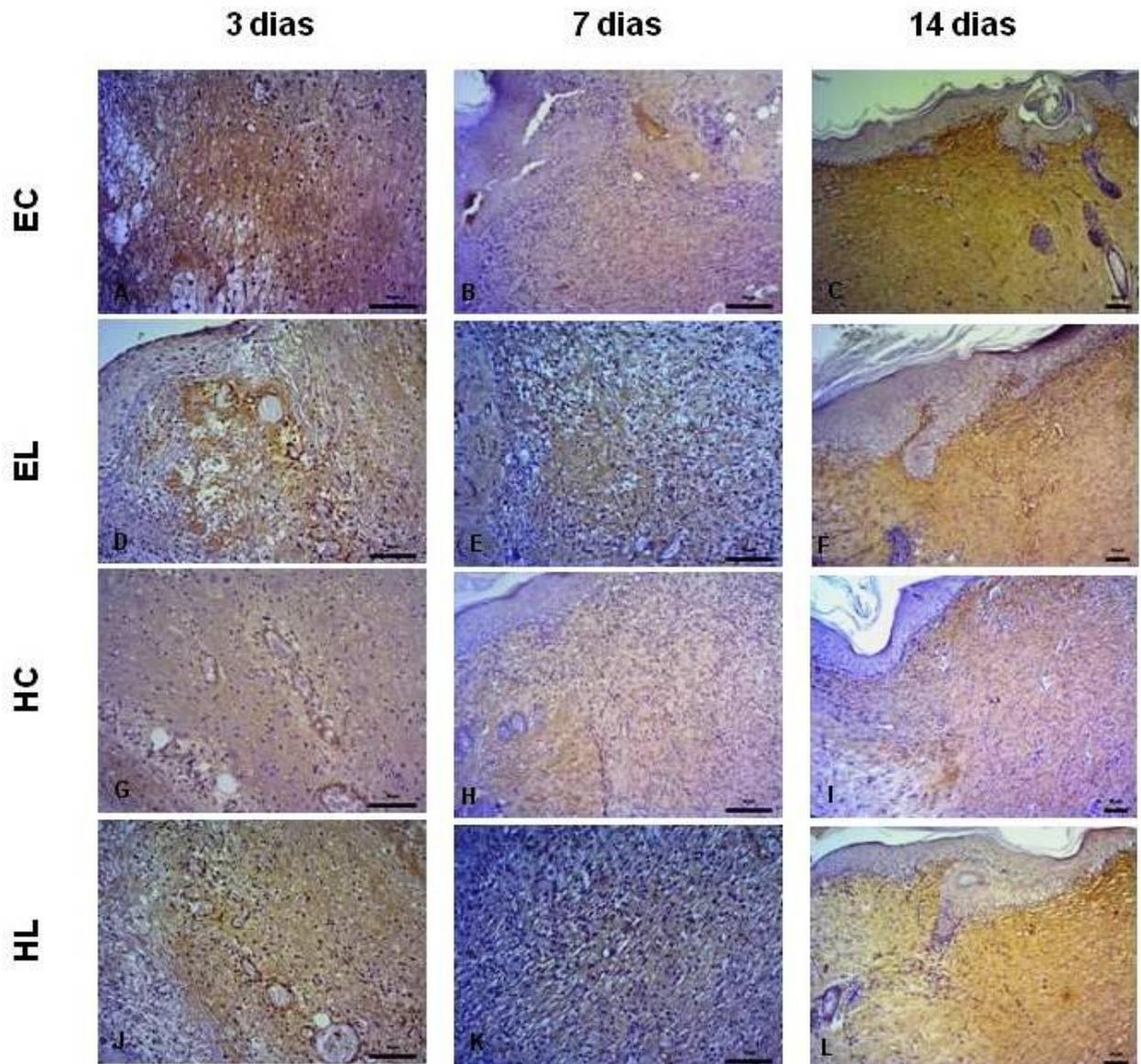


Figura 12 - Imunoexpressão do colágeno tipo I. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno I na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Todos os grupos apresentaram evolução da expressão de colágeno tipo I, contudo o grupo EC apresentou maior expressão quando comparado ao HC, e o grupo HL em comparação ao grupo HC aos 3 dias ($P < 0,05$). A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunoexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Imagens do 3º e 7º dia (200x), Imagens 14º dia (100x).

Colágeno III

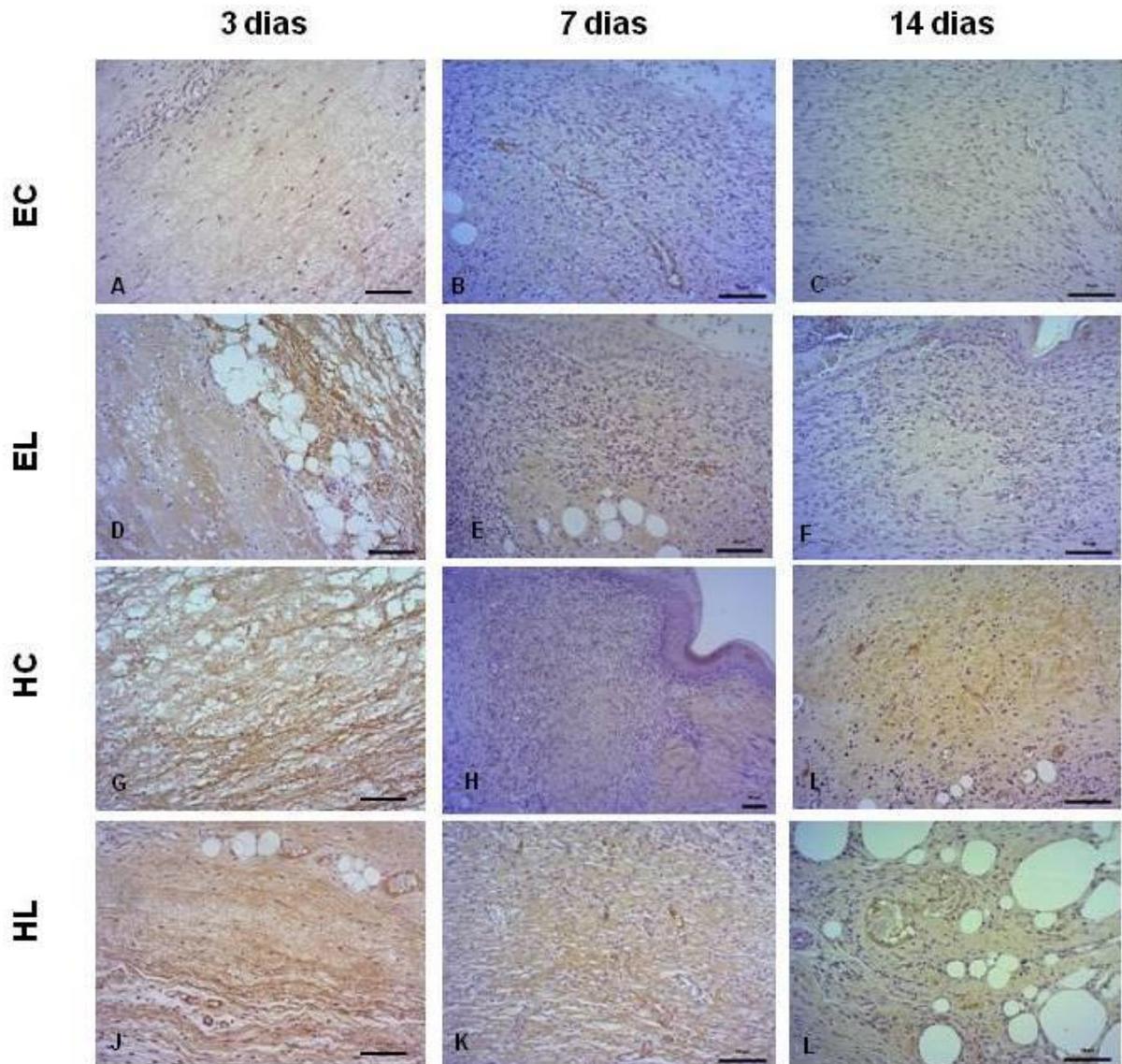


Figura 13 - Imunoexpressão do colágeno tipo III. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno III na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Todos os grupos apresentaram diminuição da expressão de colágeno III, embora o grupo HC tenha demonstrado maior imunoexpressão aos 3 dias comparado ao grupo EC, da mesma forma o grupo HL se mostrou em relação ao grupo EL ($P < 0,05$). A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunoexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Todas as Imagens (200x), exceto Imagem H (100x).

Fibronectina

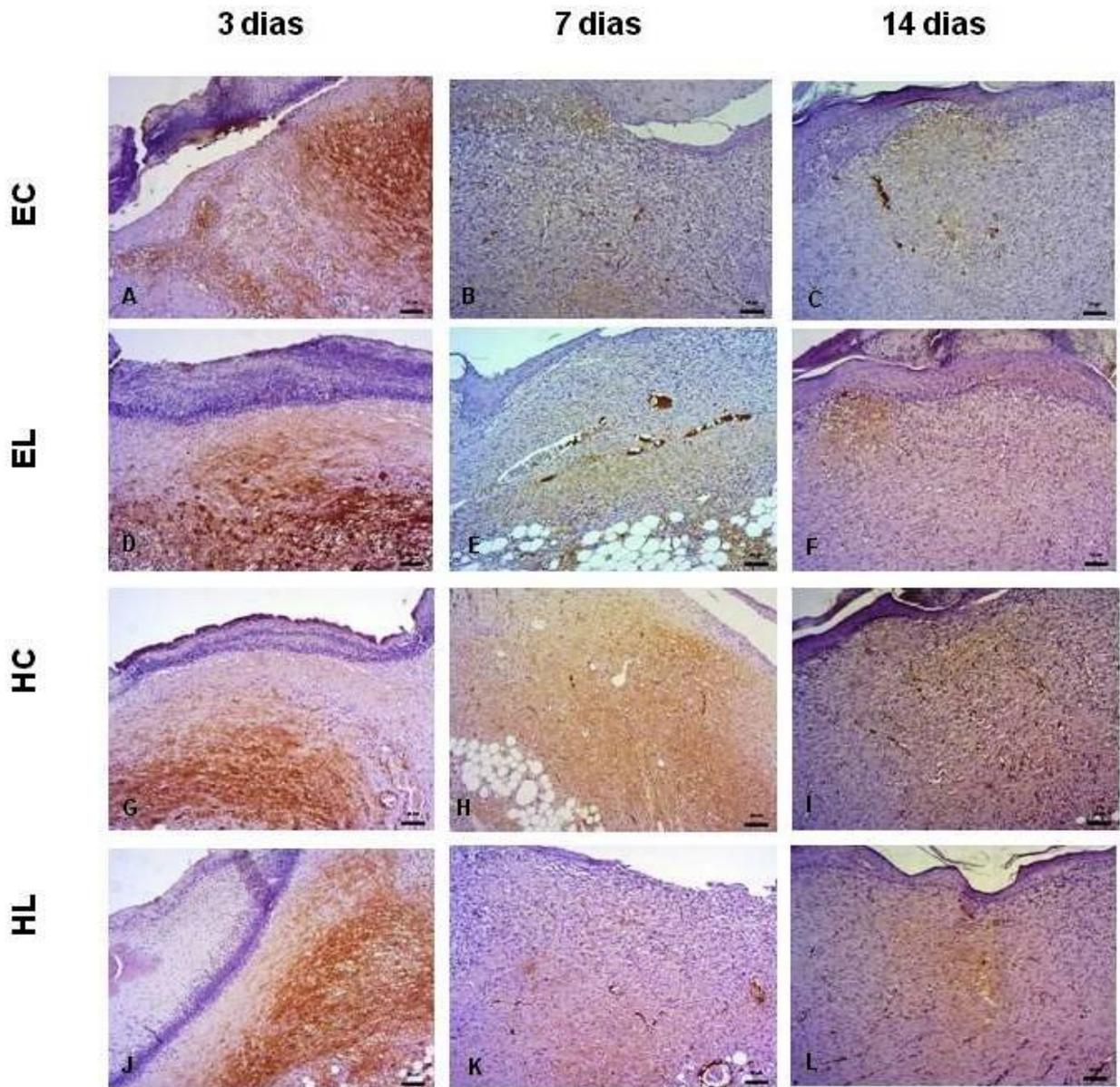


Figura 14 - Imunoexpressão da fibronectina. As imagens microscópicas mostram a expressão do colágeno I na área da ferida nos dias 3, 7 e 14 após a confecção da ferida. Os grupos hipotireoidianos apresentaram diminuição da deposição de fibronectina de modo semelhante ao grupo eutireoidiano. A: grupo eutireoidiano controle três dias; B: grupo eutireoidiano controle sete dias; C: grupo eutireoidiano controle 14 dias; D: grupo eutireoidiano laser três dias; E: grupo eutireoidiano laser sete dias; F: grupo eutireoidiano laser 14 dias; G: grupo hipotireoidiano controle três dias; H: grupo hipotireoidiano controle sete dias; I: grupo hipotireoidiano controle 14 dias; J: grupo hipotireoidiano laser três dias; K: grupo hipotireoidiano laser sete dias; L: grupo hipotireoidiano laser 14 dias. Observa-se um maior imunoexpressão no 14º dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens em objetiva de 100x.

5.3.2 IMUNOMARCAÇÃO α -SMA

A avaliação dos miofibroblastos, identificados pela imunorreatividade do anticorpo α -SMA, revelou a presença deste tipo celular em todos os grupos e em todos os períodos avaliados e está representada na tabela 3. Os mesmos apresentaram forte marcação citoplasmática e /ou nuclear e apresentou morfologia alongado e fusiforme. As células estavam localizadas no tecido de granulação, aos 3 dias observam-se mais nas bordas da ferida e dispostas de maneira aleatória, aos 14 dias as células estavam alinhadas paralelamente e mais localizadas no centro da ferida. Foram observados valores médios de células que variaram de 13,00 a 80,87 a depender do período avaliado. As células musculares lisas das paredes dos vasos sanguíneos das amostras também demonstraram positividade para α -SMA em todos os espécimes, porém foram excluídos da análise.

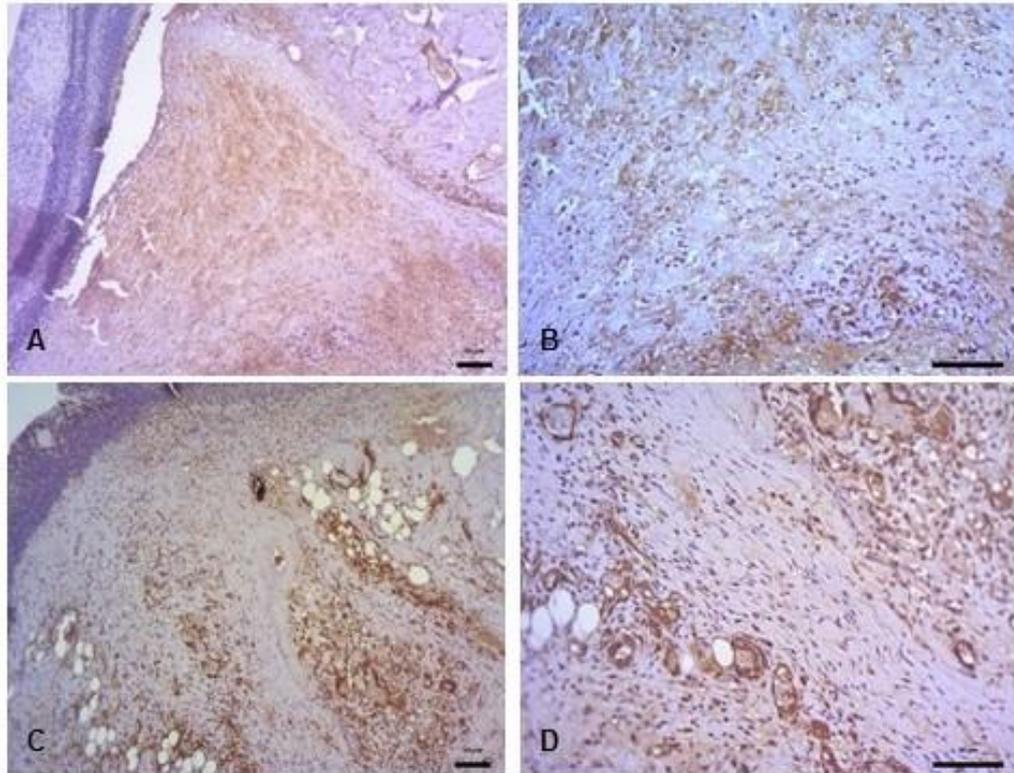
Tabela 3 - Valores médio de células α -SMA positivas nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos aos 3, 7 e 14 dias.

Grupo	n	Média (Desvio padrão)		
		3 dias	7 dias	14 dias
EC	6	22.67 (4.28)	67.40 (5.49)	70.30 (14.64)
EL	6	24.43 (3.49)	73.00 (12.88)	60.53 (23.17)
HC	6	13.00 (1.85)	52.50 (24.09)	51.70 (5.05)
HL	6	14.87 (3.40)	80.87 (24.39)	60.83 (15.62)

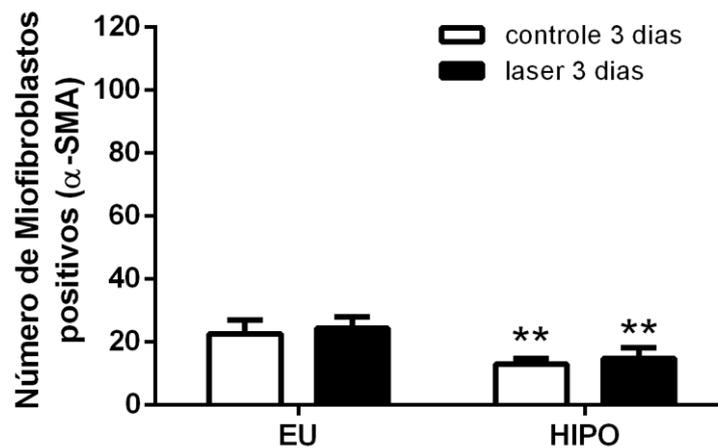
Aos 3 dias, verificou-se o maior número médio de células positivas no grupo EL, em contraste com o grupo HC que apresentou o menor número médio de células dentro do período. Não houve diferença estatística entre os grupos eutireoidiano e hipotireoidiano controles com os seus grupos irradiados. Entretanto, pode-se observar que o número de miofibroblastos foi significativamente maior nos grupos EC e EL que no grupo HC e HL, respectivamente ($p=0.000$) Figuras (15).

Figura 15 - Expressão do α -SMA. 1. Imagem representativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida no 3º dia após a confecção da ferida nos grupos eutireoidianos controle (A-B) e hipotireoidiano controle (C-D). Objetiva de 100x (A e C) e de 200x (B e D). 2. Comparação entre a expressão do α -SMA nos grupos eutireoidiano e hipotireoidianos controle e irradiados aos 3 dias * ($p=0.000$ Teste ANOVA).

1



2



Aos 7 dias, o maior número de células positivas foi encontrado nos grupos irradiados, tendo a maior média de imunomarcação no grupo HL, seguidos dos grupos EL, EC e HC (Figura 16). Neste período, não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0.05$). Embora, o grupo hipotireoidiano irradiado tenha apresentado uma imunomarcação maior que o seu grupo controle.



Figura 16 – Fotomicrografia da expressão do α -SMA. **A.** Imagem rrepresentativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida no 7º dia após a confecção da ferida no grupo HC no aumento de 100x . **B** imagem mais aproximada no aumento de 200x. Em C observam-se com detalhes as células marcadas positivamente pra o α -SMA.

Aos 14 dias, pode-se observar redução do número de células imunomarcadas nos grupos irradiados, embora os grupos controle tenha mantido a média do número de células, porém sem diferença estatística (Figura 17).

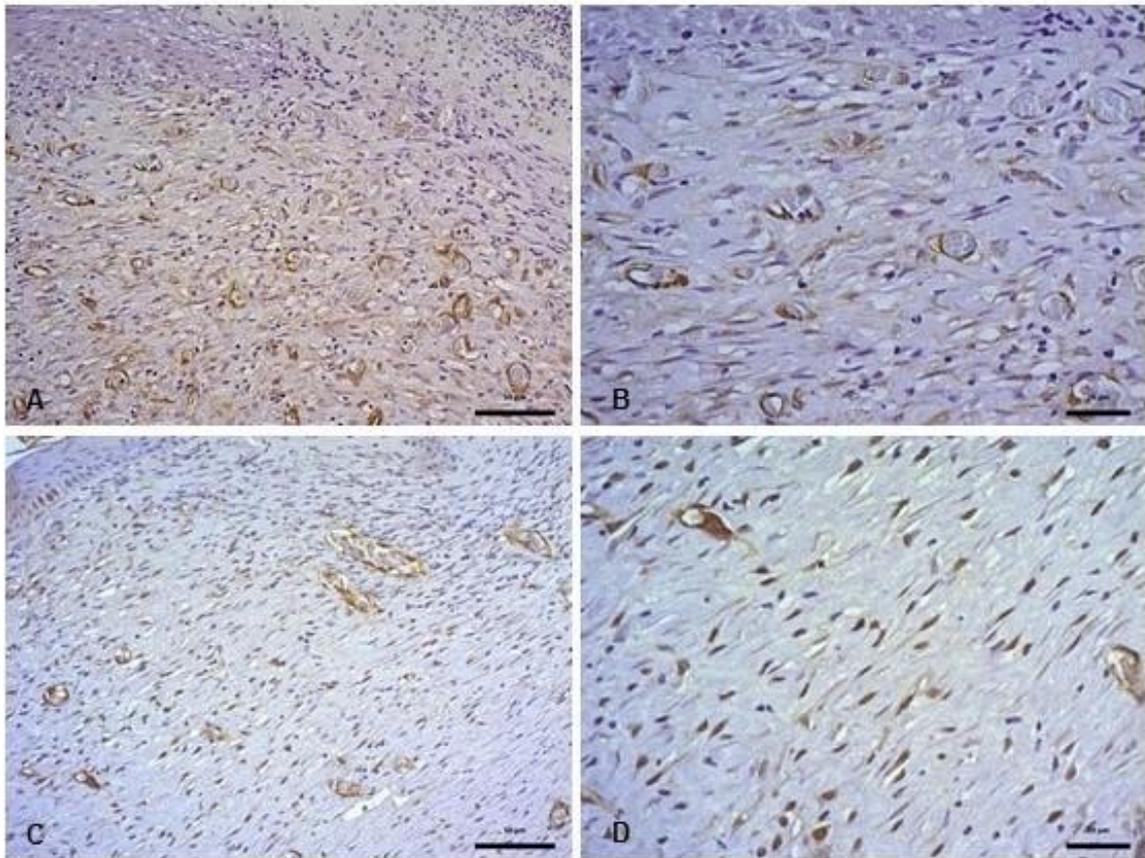


Figura 17 - Fotomicografia da expressão do α -SMA aos 14 dias. A- Imagem representativa mostra a expressão da α -SMA na área da ferida do grupo eutireoidianos controle. Em B, imagem em maior aumento demonstrado a fraca marcação α -SMA. C - D Imagem do grupo hipotireoidiano irradiado com presença de células α -SMA. Objetiva de 100x (A e C) e de 200x (B e D).

Quando os grupos foram comparados entre os tempos. No grupo EC, houve aumento no número de células α -SMA + no sétimo dia ($p=0,000$), que se manteve aos 14 dias, porém sem diferença estatística. O grupo EL apresentou aumento do número de imunomarcação aos 7 dias ($p=0,000$) com diminuição na imunomarcação aos 14 dias (Figura 18).

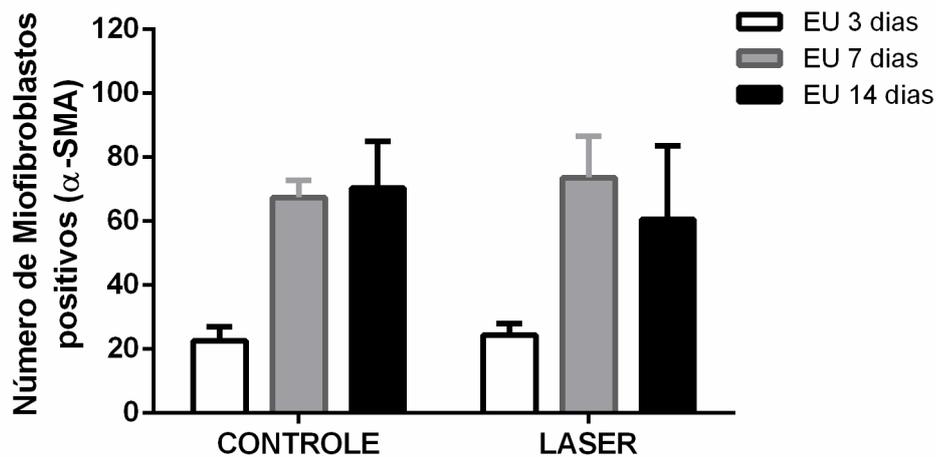


Figura 18 – Comparação entre os grupos eutireoidianos avaliados em 3, 7 e 14 dias em relação à imunomarcação de FSP1.

Nos grupos hipotireoidianos, o grupo HC também manteve o pico de número de células positivas aos 7 dias, com diferença estatística entre os neste período ($p=0,000$) e manteve-se constante ao ser avaliado aos 14 dias. No grupo irradiado HL observou-se aumento no número de células α -SMA+ aos 7 dias com diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$), e aos 14 dias mostrou-se com menor imunomarcação (Figura 19).

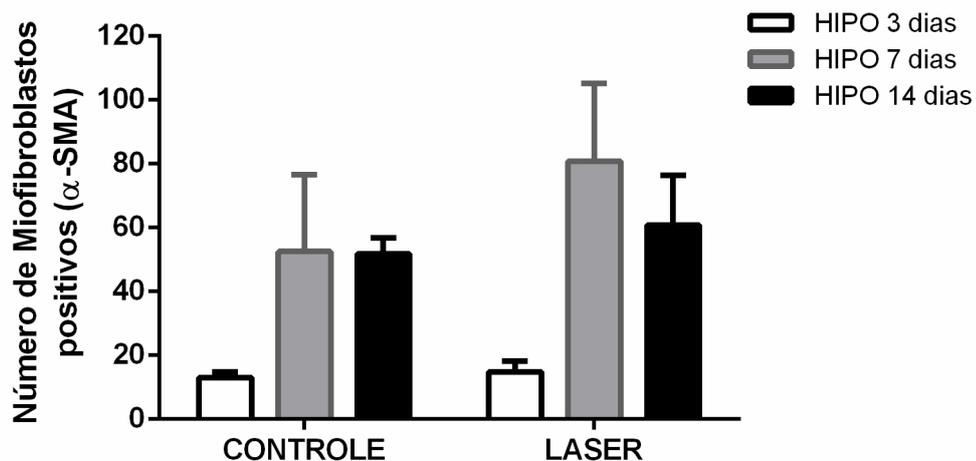


Figura 19 - Comparação entre os grupos hipotireoidianos avaliados em 3, 7 e 14 dias em relação à imunomarcação de FSP1.

5.3.4 IMUNOMARCAÇÃO FSP1

A avaliação dos fibroblastos, identificados pela imunorreatividade do anticorpo FSP1, revelou a presença deste tipo celular em todos os grupos e em todos os períodos avaliados e está representada na tabela 4. Os mesmos apresentaram forte marcação citoplasmática e /ou nuclear e apresentou morfologia alongado e fusiforme. As células foram localizadas no tecido de granulação. Foram observados valores médios que variaram de 9,07 a 30,23 a depender do período avaliado. Algumas células inflamatória também demonstraram positividade para FSP1 em alguns casos, porém foram excluídos da análise.

Tabela 4 - Valores médio de células FSP1 positivas nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos aos 3, 7 e 14 dias.

Grupo	n	Média (Desvio padrão)		
		3 dias	7 dias	14 dias
EC	6	17.00 (11.38)	21.77 (10.03)	12.23 (4.00)
EL	6	13.5 (8.94)	28.95 (6.80)	10.36 (3.69)
HC	6	6.66 (1.09)	26.90 (12.06)	11.33 (6.38)
HL	6	9.66 (3.15)	24.37 (11.68)	30.23 (10.69)

Aos 3 dias, verificou-se o maior número médio de células positivas no grupo EC, em contraste com o grupo HC que apresentou o menor número médio de células dentro do período. Embora os grupos irradiados tenham apresentado maior número de células positivas, não houve diferença estatística entre os grupos eutireoidiano e hipotireoidiano controles com os seus grupos irradiados. Quando os grupos eutireoidianos foram confrontados com os grupos hipotireoidianos também não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Aos 7 dias, o maior número de células positivas foi encontrado nos grupos irradiados, tendo a maior média de imunomarcação no grupo HL, seguidos dos grupos EL, EC e HC. Neste período, não houve diferença significativa entre os

grupos ($P>0.05$). Embora, o grupo hipotireoidiano irradiado tenha apresentado uma imunomarcção bem maior que o seu grupo controle.

Aos 14 dias, pode-se observar redução do número de células imunomarcadas nos grupos eutireoidianos e no grupo HC. Entretanto, no grupo hipotireoidiano irradiado houve um aumento do número de células imunomarcadas quando comparado ao período anteriormente analisado. Essa diferença foi estatisticamente significante quando comparado o grupo HL com os demais grupos avaliados neste período ($p=0,000$).

Quando os grupos foram comparados entre os tempos. No grupo EC, houve aumento no número de células FSP1+ no sétimo dia e regressão aos 14 dias, porém sem diferença estatística. O grupo EL manteve o mesmo padrão que seu grupo controle, porém com diferença estatística entre os períodos de 3-7 dias ($p=0,001$) e 7-14 dias ($p=0,001$).

Nos grupos hipotireoidianos, o grupo HC também manteve o pico de número de células positivas aos 7 dias, com diferença estatística entre os períodos de 3-7 dias e 7-14 dias ($p=0,001$). Já o grupo irradiado HL manteve um aumento progressivo no número de células FSP1+, com diferença estatisticamente significante entre os dias 3-14 ($p=0,004$)

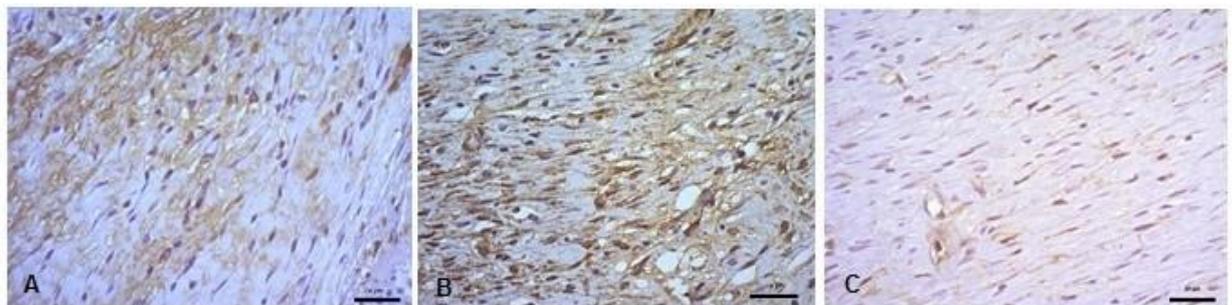


Figura 20 - Fotomicrografia da expressão do FSP1 nos períodos de 3, 7 e 14 dias. A- Presença discreta de células FSP1 + na área da ferida do grupo eutireoidianos controle. Em B, imagem demonstra aumento na positividade da marcação. C Imagem aos 14 dias demonstrando diminuição na imunorreatividade. Objetiva de 200x.

6. DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos desempenham papéis importantes na diferenciação, crescimento e metabolismo celular. Assim, o estudo das disfunções desses hormônios tem importantes implicações médicas e biológicas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos do hipotireoidismo e da fototerapia a laser na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Este estudo mostrou que o hipotireoidismo retarda o processo cicatricial, e que a fototerapia laser promove a biomodulação da cicatrização em ratos hipotireoidianos.

Diferentes métodos de indução ao hipotireoidismo são relatados na literatura (Hayat et al., 2016; De Jesus et al., 2015; Patel et al., 2013). Neste trabalho, utilizou-se a tireoidectomia para induzir o hipotireoidismo, evitando possíveis efeitos os colaterais causados pelas drogas antitireoidianas, pois a destruição química pelo uso de drogas antitireoidianas altera a hematopoiese, comprometendo o organismo (Chang et al., 2014). Por outro lado, como a remoção cirúrgica da glândula tireoide pode envolver a remoção de células parafoliculares secretoras de calcitonina e da glândula paratireoide e, portanto, alterar a homeostase de circulação de cálcio, adotou-se a ingestão de reposição de cálcio aos animais do grupo hipotireoidiano, para evitar esta deficiência.

A análise das dosagens dos hormônios tireoidianos T3 e T4 permitiu constatar o estado de hipotireoidismo dos animais, os quais apresentaram concentrações hormonais diminuídas. Este método de avaliação já é consolidado na literatura e vem sendo utilizado para diagnóstico do hipotireoidismo, em especial o hipotireoidismo clínico onde a taxa laboratorial dos hormônios tireoidianos encontram-se bem abaixo das concentrações normais. (Uzêda e Silva et al., 2017; Hayat et al., 2016; De Jesus et al., 2015; Paraguassu et al., 2014; Patel et al., 2013).

Estudos realizados por Patel et al., 2013; Alva-Sanchez et al., 2012 afirmam que no início do hipotireoidismo os ratos tornam-se hipofágicos, devido à diminuição do taxa metabólica e degradação de macronutrientes e, conseqüentemente apresentam perda de peso. Assim, a redução do ganho de peso corporal observada

nos animais hipotireoidianos no presente estudo já era esperada, o que corrobora com outros trabalhos (Chang et al., 2014; Ferreira et al., 2007).

Em estudo recente, Hayat et al., (2016) ao avaliarem o efeito do hipotireoidismo em ratos, observaram que houve um ganho reduzido do peso dos animais em comparação ao grupo eutireoidiano. Eles justificaram o achado ao fato dos hormônios tireoidianos desempenharem papel importante na homeotermia; e o hipotireoidismo, presumivelmente induzir vários mecanismos alternativos no metabolismo do tecido adiposo branco em resposta à deficiência da termogênese induzida pelo hipotireoidismo o que, provavelmente, também explica o ganho de peso reduzido dos animais experimentais nesse estudo.

O efeito da fototerapia a laser como agente biomodulador é um dos aspectos mais explorados na literatura (Diwan et al., 2017; Uzêda e Silva et al., 2017; De Castro et al., 2014; Desal et al., 2014; Kim et al., 2013; Elliot et al., 2013). Seu uso durante o processo de cicatrização influencia todas as fases deste complexo processo. Entretanto, a literatura é escassa em estudos desta terapia na cicatrização de hipotireoidianos (Paraguassu et al., 2014; Ramalho et al., 2010).

Diante dos conhecidos benefícios da aplicação do laser nos diversos tecidos já demonstrados na literatura, alguns autores (Hawkins & Abrahamse, 2006; Chen et al., 2005) relatam resultados controversos em que a laserterapia não obteve nenhum efeito, ou mesmo inibiu o processo de reparo. Estes resultados tendem a ocorrer devido ao uso de diversificados modelos experimentais, tipos de lasers, comprimento de onda, potência, fluência, tempo, frequência e número de irradiações. Embora, alguns estudos que utilizaram parâmetros similares relataram resultados conflitantes (Walker et al., 2000).

Hawkins & Abrahamse (2006) avaliaram a resposta celular à exposição de 3 diferentes doses (2.5, 5.0, e 16.0 J/cm²) de irradiação. Os resultados mostraram que uma única dose de 5,0 J/cm², e duas ou três doses de 2,5 J/cm² tiveram um efeito estimulador sobre os fibroblastos, com aumento da migração e proliferação celular. Entretanto, múltiplas exposições a doses mais elevadas (16 J/cm²) causaram tensão adicional às células, o que reduziu a migração celular, a viabilidade celular, a atividade de ATP e inibiu a proliferação celular. Como neste estudo, pode-se

observar que uma dose de energia de 2,5 J/cm², combinada a exposições fracionadas, é necessária para que a atividade mitocondrial seja estimulada sem que ocorram danos adicionais às células, e os efeitos biomoduladores da fototerapia a laser sejam alcançados.

Mendez et. al. (2004) avaliaram os efeitos dos comprimentos de onda vermelho (685nm) e infravermelho (830nm), além do uso de 2 doses de energia na cicatrização de feridas de ratos. Eles observaram que os experimentos com menores doses de energia obtiveram os melhores resultados, independente do comprimento de onda utilizado. E, a associação dos dois comprimentos de onda foi benéfica no aumento da deposição de colágeno, correlacionando este fato à ação do laser em diferentes níveis de profundidade do tecido. Contudo, neste estudo e os trabalhos de Santana et al. (2015) Colombo et al. (2013), Biondo-Simões et al. (2010), que envolveram cicatrização tecidual de feridas excisionais, mostraram resultados satisfatórios com o uso de comprimentos de ondas vermelhos. Os comprimentos de onda são variados e apresentam diferentes níveis de ação para cada tipo de tecido, portanto a escolha deve ser direcionada ao tipo de estudo pretendido e, feridas superficiais absorvem melhor os comprimentos de ondas vermelhos (Fortuna et al., 2017; Kilik et al., 2010).

Quando a laserterapia é utilizada de maneira adequada como ferramenta para promover o reparo tecidual, sua ação pode ser visualizada em todas as etapas deste processo. A literatura indica que a fotobiomodulação a laser acelera a inflamação, promove a proliferação de fibroblastos, facilita a síntese de colágeno, estimula a imunidade e, portanto, acelera a cicatrização (Diwan et al., 2017; Uzêda e Silva et al., 2016; De Castro et al., 2016).

A inflamação é a primeira fase do processo de cicatrização, sendo uma das etapas que pode ser modulada pela fototerapia a laser e por isso essa técnica é amplamente difundida com esta finalidade (Busnardo & Biondo-Simões, 2010). Viegas et al. (2007) compararam os efeitos da laserterapia utilizando dois comprimentos de onda (685 nm e 830 nm) e uma droga antiinflamatória na modulação da resposta inflamatória durante o reparo tecidual em diferentes tempos cirúrgicos no período de 7 dias. Eles observaram que os resultados foram similares para os dois comprimentos de onda, apesar de seus diferentes mecanismos de ação

nas células. Porém, em comparação com o grupo controle e o grupo antiinflamatório, uma melhor qualidade histológica durante o reparo foi observada nos grupos irradiados, o que é favorável para a recuperação do tecido, porém, não foram observados efeitos antiinflamatórios do laser na cicatrização das feridas.

Neste estudo, foi possível observar que o infiltrado inflamatório foi mais duradouro e intenso no grupo hipotireoidiano controle quando comparado ao grupo eutireoidiano, bem como ao seu grupo irradiado aos 7 dias, concordando com os estudos que afirmam que o processo inflamatório em situações em que há comprometimento sistêmico tende a ser mais prolongado (Uzêda e Silva et al., 2016; Santana et al, 2015). Os achados deste trabalho corroboram com Zimmermann et al. (2009) que evidenciaram um infiltrado inflamatório persistente na ferida dos ratos que contribui para o retardo na cicatrização do grupo hipotireoidiano. Nas fases iniciais da ferida, as células inflamatórias são importantes para o debridamento da área e liberação de citocinas e fatores de crescimento. Porém, estes eventos, quando postergados, também aumentam a produção de oxidantes que podem conduzir à necrose celular (Silveira et al., 2011).

A angiogênese no início do processo de reparo é imprescindível para carrear oxigênio e nutrientes essenciais para a neoformação tecidual. Insuficiente angiogênese nesta fase pode postergar o reparo (Rettinger et al., 2017). Entretanto, na fase de remodelação há diminuição na densidade vascular e aumento na deposição de colágeno. A maior proliferação vascular foi encontrada no grupo HL aos 7 dias quando comparado ao controle, o que denota o efeito favorável da fototerapia. Este estudo corrobora com Colombo et al., 2013 que afirma o efeito proangiogênico do laser ao observar o aumento do número de vasos nas feridas de ratos irradiados com laser (660nm) comparados com os grupos não irradiados. Recentemente, Uchinaka et al. (2017), observaram, através de imunoistoquímica, um reparo tecidual mais eficiente na ferida de ratos devido à formação de novos vasos sanguíneos presentes na área da ferida aos 7 dias.

A reepitelização da ferida é importante nos primeiros dias da cicatrização, pois proporciona uma barreira física entre o meio ambiente e o organismo, e permite a continuidade do processo de cicatrização sem interferências de agentes externos e patógenos (Shen et al., 2017). As lesões incisionais são normalmente

reepitelizadas dentro de 24-48 horas após a lesão inicial, entretanto, as feridas excisionais podem demorar mais tempo para reepitelizar (Monaco & Lawrence, 2003).

Observou-se que o hipotireoidismo prolongou o período de início da reepitelização, e a laserterapia promoveu a proliferação dos queratinócitos das margens da ferida em direção a área descoberta logo no início do período de avaliação do processo cicatricial, aos 3 dias. Nestes casos, foi encontrado epitélio estratificado, em fase de organização, indicando uma aceleração do processo de cicatrização. É conhecido que os principais estimuladores da migração e proliferação dos queratinócitos são os fatores de crescimento e as citocinas. Estes vêm sendo comercializados e têm se mostrado eficazes na cicatrização de feridas (Shen et al., 2017; Kim et al., 2013; Liem et al., 2013). Deste modo, estudos como o de Colombo et al., (2013) confirmam que a laserterapia estimula a expressão de fatores de crescimento no ambiente da ferida, contribuindo assim para a reepitelização, como demonstrado neste estudo.

No período de 7 dias todos os grupos apresentaram mais da metade da ferida recoberta, sem diferença estatisticamente significativa. Este resultado discorda dos encontrados por Ramalho et al., (2010) que avaliaram a influência das Fototerapia laser (660nm) e Luz polarizada com o uso de 20 ou 40J/cm² na cicatrização de feridas de ratos hipotireoidianos e observaram reepitelização melhorada, e em alguns casos completa, aos 7 dias nos grupos irradiados com Laser quando comparados aos grupos não irradiados. Porém, neste mesmo estudo pode-se observar que o uso de 40J/cm² de luz polarizada tenha sido prejudicial à reepitelização e, mais da metade dos casos irradiados não apresentaram nenhum sinal de reepitelização. Por isso, enfatiza-se que o uso de protocolos padronizados de laserterapia são essenciais para a obtenção de resultados satisfatórios.

No período mais tardio, aos 14 dias, foi possível observar o maior grau de reepitelização nos grupos eutireoidianos quando comparados ao grupo hipotireoidiano, irradiado ou não, demonstrando que o hipotireoidismo retarda a reepitelização completa das feridas. Isso devido ao conhecimento sobre o controle molecular dos hormônios tireoidianos na diferenciação epidérmica e proliferação de queratinócitos (Antonini et al., 2013).

A confecção de feridas excisionais mais extensas acarreta em maior distância entre os bordos da ferida e maior quantidade de tecido a ser reparado, e conseqüentemente de maior formação de tecido de granulação que nas feridas de tamanhos menores realizadas. Por isso, neste estudo, onde foi realizada feridas excisionais de 1cm x 1cm, aos 14 dias, nem todos as amostras apresentavam reepitelização completa, diferindo de trabalhos como o de Uchinaka et al (2017) que avaliaram a cicatrização de ratos com feridas padronizadas em 5mm e observaram aos 14 dias reepitelização completa de todos os animais. Portanto, em feridas maiores, maior será o tempo necessário para repavimentação.

Estudos têm demonstrado o efeito da luz laser na proliferação celular durante o processo de reparo. Usume et al. (2017) investigaram os efeitos da laserterapia (635 nm) na taxa proliferativa de fibroblastos em estudo *in vitro* e *in vivo*. As células irradiadas no estudo *in vitro* revelaram uma considerável atividade proliferativa superior às células não irradiadas após 24 horas. Na avaliação das feridas dos ratos, as diferenças foram significativas 3 dias após a irradiação. Vinck et al. (2003) avaliaram a proliferação celular após laserterapia em variados comprimentos de onda (950 nm, 660 nm e 570 nm) e observaram que todos os grupos irradiados apresentaram melhores resultados quando comparados com o grupo controle.

Na avaliação da proliferação fibroblástica, verificou-se diferença significativa apenas no período de 3 dias no grupo EL em comparação ao grupo HL. Contudo, aos 7 dias, período de proliferação tecidual, mesmo que sem diferença estatisticamente significante, observou-se que o grupo HC apresentou proliferação discreta em comparação aos grupos EC e HL, demonstrando que na cicatrização tecidual de hipotireoidianos há uma tendência de menor evidência de fibroblastos, o que pode ter repercutido na menor deposição de colágeno também observada no grupo hipotireoidiano controle em relação ao grupo Laser. Este resultado demonstra os efeitos fotobiomoduladores do laser na fase proliferativa do reparo e confirma resultados como os de Sampaio et al. (2013) onde um protocolo adequado da laserterapia pode estimular respostas celulares nos fibroblastos e promover a migração e proliferação celular sem causar estresse ou destruição às células.

Na fase proliferativa, além da proliferação fibroblástica, a deposição de MEC é essencial para o reparo tecidual. A Matriz extracelular é uma complexa rede de

proteínas e outras macromoléculas. Dentre elas, a fibronectina é uma das maiores glicoproteínas, com função de promover a adesão celular (Sousa et al., 2014, Bielefeld et al., 2011). Já o colágeno é o principal componente estrutural, fundamental para assegurar as melhores propriedades mecânicas do tecido. Essa atividade biológica depende da organização e distribuição das fibras de colágeno. A proporção de Colágeno I e colágeno III é importante para a formação do tecido conjuntivo e progressão da cicatrização de feridas cutâneas (Desai et al., 2014; Elliot et al., 2011).

Os achados deste trabalho demonstram que houve maior deposição e distribuição das fibras colágenas entre os grupos HL quando comparado ao grupo HC nos períodos de 7 dias. Aos 14 dias também foi possível observar essa tendência, porém sem diferença estatística. Este estudo corrobora com De Castro et al., (2014) que avaliaram a influência das fototerapias Laser e LED na deposição colagênica de feridas cirúrgicas de ratos e observaram maior síntese de colágeno durante o processo cicatricial dos grupos irradiado. Posteriormente, Santana et al., (2015) também demonstraram que a laserterapia, no comprimento de onda de 660nm e baixas doses de energia, aplicada em regiões que necessitem de reparo tecidual promove deposição de colágeno mais organizada, essencial para o completo fechamento da ferida.

Diferindo do estudo realizado por Paraguassu et al., 2014 que observaram que os animais hipotireoidianos apresentaram feridas com menor deposição colagênica quando comparada ao grupo eutireoidiano aos 7 dias, o presente estudo não encontrou diferenças estatísticas. Porém, observou-se, aos 3 e 14 dias, maior grau de deposição de colágeno nos grupo eutireoidianos.

A avaliação imunoistoquímica da expressão de proteínas em diferentes fases do reparo tecidual de ratos hipotireoidianos pode fornecer importantes informações para validar a eficácia da laserterapia. Por isso, neste estudo foram avaliados a expressão imunoistoquímica da fibronectina e dos colágenos I e III, pois como demonstrado por Slavskovsky et al. (2011), o balanço entre a síntese e a degradação de MEC é importante para a cicatrização normal.

A formação de MEC, bem como a ligação entre os seus componentes, é o ponto chave do processo de reparo tecidual. A formação de uma matriz de colágeno I e III é dependente da rede de fibronectina pré-existente. O relacionamento entre fibronectina, fibroblastos e miofibroblastos é fundamental para o balanço entre a formação da cicatriz e contração da ferida (Widgerow, 2011).

Por isso, neste estudo a expressão da fibronectina também foi avaliada. A fibronectina é conhecida como um componente essencial durante o processo de reparo, pois gera um arcabouço que viabiliza a adesão e a migração celular (Kibe et al., 2017). Aos 3 dias após a confecção da ferida, pode-se observar intensa expressão de fibronectina em todos os grupos avaliados, este padrão variou de intensa a discreta aos 7 dias. Neste trabalho não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de fibronectina na área da ferida entre os grupos eutireoidianos e hipotireoidianos. Contudo, pode-se observar que os grupos hipotireoidianos mantiveram maior expressão desta proteína ao longo dos 14 dias em comparação com os grupos eutireoidianos, que apresentaram redução gradual da expressão da fibronectina.

Estes achados estão de acordo com Sousa et al. (2014), Bielefeld et al. (2011), que mostraram expressão transiente da fibronectina em cicatrização de feridas sob condições normais. De acordo com Lenselink (2015), a fibronectina é depositada nos estágios iniciais da cicatrização, e na fase de remodelação ela precisa ser degradada e removida do tecido para dar lugar à deposição de colágeno. Os resultados deste trabalho indicam que o hipotireoidismo prolongou a expressão da fibronectina, com um padrão similar ao visto nas fases iniciais do processo de cicatrização normal.

Com relação à fototerapia, pode-se observar que a luz laser não atuou de modo biomodulador. Nenhuma diferença significativa na expressão da fibronectina foi observada entre os grupos estudados em nenhum dos tempos avaliados. Aos 3 dias, intensa expressão pode ser observada, e variou de intensa a discreta aos 7 dias. É possível que o hipotireoidismo tenha alterado a expressão da fibronectina na ferida que não foi modificada pela luz laser.

Considerando o tempo de progressão do reparo, efeitos positivos e negativos podem estar associados com a presença de colágeno. A identificação do aumento do colágeno I em detrimento ao colágeno III, como encontrado neste trabalho, é considerada apropriada ao longo do período do processo de cicatrização. Tradicionalmente, esta substituição é um importante indicador da progressão do processo de reparo e visa promover maior força tênsil da ferida durante a fase de remodelação. Isso indica o quanto este tecido se aproxima do tecido normal, como demonstrado em outros trabalhos (Santana et al., 2015; Klingberg et al., 2013).

Ao avaliar os tipos de colágeno, a análise da imunexpressão de colágeno tipo I, durante o curso do tempo de cicatrização de feridas mostrou colagenização progressiva ocorrendo nos 3 períodos experimentais, embora diferença estatística tenha sido observada apenas entre os grupos controles (EC e HC) e entre os grupos hipotireoidianos (HL e HC), demonstrando a influência negativa do hipotireoidismo na deposição de colágeno tipo I, e a fotobiomodulação promovida na presença deste distúrbio endócrino.

Apenas o grupo HC, ao final do período experimental, manteve-se com menor grau de deposição de colágeno tipo I. Em concordância com estes dados, estudos realizados por Busnardo & Biondo Simões (2010) na avaliação do efeito da irradiação Laser (632.8nm, 4J /cm², 36s) no reparo tecidual de ratos, encontraram o mesmo perfil de deposição colagênica nos animais irradiados avaliados através da marcação com Picrosírius, porém sem diferença estatisticamente significativa. Isso pode ter ocorrido devido ao baixo tempo de exposição da luz laser sobre o tecido.

Sabe-se que o processo inflamatório interfere diretamente na dinâmica da MEC e o prolongamento da fase inflamatória é um fator que leva ao atraso na cicatrização (Uzêda e Silva et al, 2016). É possível que este padrão de discreta deposição de colágeno I verificado no grupo HC, seja devido à presença deste infiltrado inflamatório na ferida, acarretando na liberação de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação de componentes teciduais no local (Silveira et al., 2011).

Paraguassú et al. (2014) analisaram através de imunistoquímica a expressão dos colágenos I e III de feridas de ratos. Os autores utilizaram a

fototerapia Laser na ferida de ratos eutireoidianos e hipotireoidianos por 7 ou 14 dias. Eles encontraram uma significativa diferença na imunoexpressão do colágeno I entre os grupos irradiados com seus respectivos grupos controles nos dois tempos experimentais. Entretanto a comparação entre eutireoidianos e hipotireoidianos irradiados não apresentou diferença significativa, demonstrando que a luz laser promoveu deposição colagênica de modo similar nos dois grupos.

Maligiere et al., (2017) utilizaram a Fototerapia Laser (670nm, 30mW, 4,93 ou 9,86J/cm²) nas queimadura de ratos por 2, 10 e 18 dias. Eles observaram predominância de colágeno tipo I com diminuição do colágeno III no grupo irradiados em comparação com o grupo de controle. Portanto, a laserterapia foi mais eficaz no processo de cicatrização e atuou como um bioestimulador. Já Fiorio et al., 2013 utilizaram a Fototerapia Laser (670nm,35mW, 4,93 ou 9,86J/cm²) nas queimadura de ratos por 8 e 16 dias e observaram maior deposição de colágeno I nos grupos queimado e irradiados em comparação ao grupo de controle, mas aos 16 dias observaram que o colágeno I permaneceu na ferida do grupo queimado, mas nos grupos irradiados e controle foi observada maior deposição de colágeno III, eles sugeriram a eficácia do laser na deposição do tecido altamente estruturado. Contudo, a literatura consultada relata que para a adequada remodelação e maturação do tecido reparado, há a necessidade da substituição do colágeno III pelo colágeno I (Maligiere et al., 2017; Slavskovsky et al., 2011; Busnardo & Biondo-Simões, 2010).

Desde que foram identificados na cicatrização de feridas de pele de ratos por Gabbini et al. em 1971, os miofibroblastos têm sido alvo de inúmeras pesquisas envolvendo o processo de cicatrização. Baseado nessas informações, nós hipotetizamos que, em vista da já bem relatada deficiência do processo cicatricial causada pelo hipotireoidismo, a diferenciação miofibroblástica seja prejudicada durante a cicatrização de hipotireoidianos, e o uso da fototerapia a Laser teria um papel biomodular na diferenciação miofibroblástica da cicatrização na presença deste distúrbio.

Para isto, foi utilizado o anticorpo α -SMA para análise da expressão imunohistoquímica, pois embora os miofibroblastos possam expressar outras proteínas e serem avaliadas através do uso de outros anticorpos como vimentina e

desmina (Desai et al., 2014; Medrado et al., 2003); a presença de α -SMA representa o marcador mais confiável do fenótipo miofibroblástico (Santana et al., 2015; Andreoli et al., 2011; Elliot et al., 2011).

Na análise dos miofibroblastos, observou-se que quanto mais intenso o processo inflamatório, menos frequente foi a identificação do número de miofibroblastos. Aos 7 dias, verificou-se maior intensidade na inflamação do grupo HC, seguido de menor deposição de colágeno e menor número de miofibroblastos, em comparação ao grupo irradiado e ao grupo eutireoidiano. Esta observação coincide com estudo de Goldberg et al. (2007) que sugerem que a presença de infiltrado inflamatório, com liberação de TNF- α , tem ação inibitória na síntese de TGF β , fator importante na diferenciação miofibroblástica. Desai et al., (2014) demonstraram *in vitro* que o tratamento de células tronco mesenquimais com TGF β promove o fenótipo miofibroblástico com aumento da expressão de α -SMA. Aliado a este fato, o uso da fototerapia laser promove o aumento na produção de fatores de crescimento, incluindo o TGF β , e desta forma, pode ter sido mais um fator favorável para a diferença estatística encontrada.

Os estudos que envolvem a disfunção tireoidiana, miofibroblastos e cicatrização de feridas, estão associados apenas ao hipertireoidismo e a comprovada formação de cicatrizes hipertóxicas (Zhang et al., 2016; Woller et al., 2016). Sendo escassos os estudos que comparem o efeito sistêmico do hipotireoidismo na diferenciação miofibroblástica, não podemos fazer comparações com outros trabalhos. Entretanto, a utilização da laserterapia e de outras terapias que promovam efeitos desejáveis sobre os miofibroblastos e a sua ação em processos cicatriciais é amplamente difundida (Diwan et al., 2017; De Castro et al., 2014; Desai et al., 2014; Kim et al., 2013; Elliot et al., 2012; Ribeiro et al., 2009, Medrado et al., 2003).

A diferença encontrada entre o número de células presentes nos grupos hipotireoidiano, estatisticamente menor em relação aos grupos eutireoidianos, aos 3 dias de cicatrização, sugere que o hipotireoidismo posterga o aparecimento e a ação contrátil dos miofibroblastos dentro da ferida. E, embora o número de miofibroblastos encontrados nas feridas do grupo HL tenha sido maior do que no grupo HC, não foi encontrada diferença estatística, mas demonstra o possível efeito biomodulador da

luz laser na diferenciação miofibroblástica na presença do hipotireoidismo. Já aos 7 dias, houve maior proliferação de miofibroblastos, estatisticamente significativa, no grupo hipotireoidiano irradiado quando comparado ao controle.

Verificou-se que nos grupos irradiados, o pico da diferenciação miofibroblástica ocorreu aos 7 dias, e então diminuiu gradativamente até os 14 dias. Já os grupos controles não apresentaram redução do número de miofibroblastos, corroborando com os achados de Elliot et al., (2012) e Ribeiro et al., (2009) que sugerem que estes dados ocorram devido a ação do laser na transformação do fenótipo miofibroblástico nos estágios mais iniciais do processo de cicatrização. E, como esperado, os miofibroblastos desapareçam por apoptose após promoverem a contração da ferida. Ao contrário, a persistência de miofibroblastos na ferida dos grupos controles sugere que a cicatrização da ferida é mais lenta e, por isso, os miofibroblastos permaneçam no local promovendo, mais tardiamente, a ação contrátil.

Medrado et al. (2003) avaliaram o efeito da laserterapia no processo de cicatrização de ferida de ratos utilizando diferentes dosagens de irradiação ($4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$) por 14 dias. Eles observaram que uma melhor ação do laser foi alcançada com o uso de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e que, o laser induziu uma série de mudanças morfológicas, que presumivelmente seriam favoráveis para a resolução da ferida, pois reduziu a reação inflamatória, induziu o aumento da deposição de colágeno e a proliferação de miofibroblastos nas feridas que utilizaram esta dosagem.

Neste estudo, utilizamos o anticorpo S100A4, também conhecido por FSP1 para identificação da população fibroblástica dos grupos avaliados. Não foi encontrada diferença entre o número de fibroblastos presentes no grupo eutireoidiano e hipotireoidiano, irradiado ou não, e nem em associação inter grupo nos períodos de 3 e 7 dias. Diferindo dos outros grupos, pode-se observar um aumento do número de fibroblastos presentes na ferida do grupo hipotireoidiano irradiado aos 14 dias. Como relatado previamente, Desai *et al.* (2014) demonstraram em estudo *in vitro* que os miofibroblastos podem retornar ao seu perfil fibroblástico através do uso de bFGF. O aumento na liberação de fatores de crescimento é um dos bem conhecidos benefícios da laserterapia, sendo o bFGF um deles (Saugun *et al.*, 2012). A ação da luz laser no tecido dos ratos hipotireoidianos pode ser um dos

fatores do aumento do número de fibroblastos na ferida aos 14 dias, tendo em vista que aos 7 dias a maior população celular na ferida foi composta por miofibroblastos que tendem a sofrer apoptose ou se desdiferenciar, logo após tenham finalizado a sua ação contrátil no ambiente da ferida cirúrgica.

Embora muitos estudos tenham utilizado o FSP1 como marcador de miofibroblastos em progressão tumoral, o uso do FSP1 em regiões de reparo tem sido pouco utilizado. Iwano *et al.*, (2002) utilizaram este marcador para identificar fibroblastos advindos da transição epitélio mesenquimal, De acordo com os autores, o FSP1 é o o marcador mais consistente de fibroblastos no tecido. Além disso, relatam que o FSP1 define um universo de fibroblastos que não expressa actina de músculo liso como os miofibroblastos que compartilham expressão similar aos vasos sanguíneos no local da injúria tecidual. Desta forma, mais estudos precisam ser realizados para elucidar alguns questionamentos das populações fibroblásticas imunomarcadas pelo uso deste anticorpo.

Visto que a cicatrização de feridas é um processo complexo e que envolve uma série articulada de eventos biológicos com o intuito de reparar o tecido, no entanto, que qualquer interferência neste sincrônico processo pode levar ao prolongamento do reparo tecidual e acarretar inúmeros prejuízos à saúde. Os achados deste estudo fornecem não apenas uma visão da influência negativa do hipotireoidismo no processo cicatricial, como também ajudam a esclarecer alguns tópicos da ação da laserterapia na regulação da cicatrização de feridas em modelos de comprometimento sistêmico como o hipotireoidismo.

A presença de miofibroblastos e proteínas da matriz extracelular em resposta à terapia a Laser é uma forte indicação do sucesso da terapia na cicatrização de feridas de ratos hipotireoidianos. Pesquisas neste sentido devem ser estimuladas, para que seus parâmetros sejam padronizados e os seus benefícios se ampliem ao mais variados problemas de saúde que possam interferir no processo de reparo tecidual.

8. CONCLUSÃO

O hipotireoidismo postergou o início do processo cicatricial nos ratos submetidos à tireoidectomia. A fototerapia a laser, nos parâmetros empregados, foi

capaz de melhorar o padrão do reparo tecidual promovendo benefícios celulares e estruturais na ferida que direcionam à melhor recuperação do tecido. Estes aspectos foram visualizados principalmente nos primeiros estágios do processo de cicatrização, denotando a importância do uso da laserterapia imediatamente após a injúria tecidual.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Watban, F.A.H.; Zhang, X.Y (2004). The Comparison of Effects between Pulsed and CW Lasers on Wound Healing. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v. 22, n.1, p. 15-18.
2. Alva-Sanchez, C. et al., (2012). The long-term regulation of food intake and body weight depends on the availability of thyroid hormones in the brain. *Neuroendocrinology Letters*, 33(7), 703-708.
3. Antonini, D. et al (2013). An intimate relationship between thyroid hormone and skin: regulation of gene expression. *Frontiers in Endocrinology*. 4(104) 1-6.
4. Agren, M.S; Werthen, M (2007). The extracellular matrix in wound healing: A closer look at therapeutics for chronic wound . *International journal of lower extremity wounds*. 6(82), p-82-97.
5. Andreoli A, Ruf M-T, Sopoh GE, Schmid P, Pluschke G (2014) Immunohistochemical Monitoring of Wound Healing in Antibiotic Treated Buruli Ulcer Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 8(4): e2809.
6. Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G., & Hinz, B. (2016). The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Research*, 5(0), 752.
7. Barrientos, S (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. v.16, p.585–601.
8. Beldon, P. Basic science of wound healing. *Surgery*. v.28, n.9, p.409-412, 2010.
9. Busnardo VL, Biondo-Simões MLP (2010). Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. *Rev bras fisioter*. 14(1):45-51.
10. Brenta, G. et al., (2013). Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism [Diretrizes clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia*, 57(4), 265–298. <https>
11. Brent, G.A (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *The New England Journal of Medicine*. v.331, n.13, p-847-5.
12. Carrol, L. Humphreys, T.R (2006). Laser: Tissue interactions. *Clinics in Dermatology*. v.24, n.1, p.2-7.

13. Chang, Yen-Jui. et al (2014). Effects of subacute hypothyroidism on metabolism and growth-related molecules. *Molecules*. v.19, p. 11178-11195.
14. Chen, W. et al. (2007). Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, Exeter, v. 39, n. 5, p. 997-1005.
15. Chen, Y. S. et al. (2005). Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery*, 25(1), 83–89.
16. Chung, H. et al (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals Biomedical Engineering*. v.40, n.2, p.516-533, February.
17. Chung, H. J. & Uitto, J. (2010). Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics*, 28(1): 93-105.
18. Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2017). Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 6–15. Coluzzi, D.J. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dental Clinics of North America*. v.48, p.751–770, 2004.
19. Colombo, F. et al. Effect of Low-Level Laser therapy ($\lambda 660\text{nm}$) on angiogenesis in wound healing: A Immunohistochemical study in a rodent model. *Brazilian Dental Journal*. v.24, n.4, 2013, p-308-312.
20. Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., & Goglia, F. (2013). Thyroid hormones and mitochondria: With a brief look at derivatives and analogues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1–2), 51–61.
21. De Castro, I.C.V. et al. Do laser and led phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen. *Lasers Med Sci*. v.29, p-1405-10, 2014.
22. Diwan, M.F.; Abid, T. A (2017) . The effect of different doses of 660 nm laser therapy on open skin wound healing in Wistar rats . *Kufa Journal for veterinarymedical sciences*, 7(2), 130-137
23. Desmoulière, A., Darby, I. A., & Gabbiani, G. (2003). Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis. *Laboratory Investigation*, 83(12), 1689–1707.
24. De Jesus V.C. et al., (2015) Influence of laser photobiomodulation (GaAIs) on salivary flow rate and histomorphometry of the submandibular glands of hypothyroid rats. *Lasers Med Sci* 30(4):1275-80

25. Desai, V.D.; Hsia, H.C.; Schwarzbauer, J.E. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLOS one*. v.9, n.1, p-1-12, 2014.
26. Eyden, B. (2008). The myofibroblast: Phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine: Translational Medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 22–37.
27. Elliott, C. et al., (2012). Periostin modulates myofibroblast differentiation during full-thickness cutaneous wound repair. *Journal of Cell Science*, 125(1), 121–132.
28. Eissa, M., & Salih, W. H. M. (2017). The influence of low-intensity He-Ne laser on the wound healing in diabetic rats. *Lasers in Medical Science*, 32(6), 1261–1267.
29. Ferreira, E. et al., (2007). Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 59(5), 1245–1249
30. Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V. & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8: 3191-3200
31. Garber, J. R. et al. Woeber for the American Association, K. A. (2012). Clinical Practice Guidelines for Hypothyroidism in Adults: Cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Thyroid*, 22(12), 1200–1235.
32. Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majno, G. (1971). Presence of myofibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contractions. *J. Exp. Med.* 27, 549–550.
33. Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology*, 200(4), 500–503.
34. Gonçalves, R.V. et al. Comparative Study of the Effects of Gallium-Aluminum-Arsenide Laser Photobiomodulation and Healing Oil on Skin Wounds in Wistar Rats: A Histomorphometric Study. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.28, n.5, p.597-603, 2010.
35. Gaitonde, D. Y., Rowley, K. D., & Sweeney, L. B. (2012). Hypothyroidism: An update. *American Family Physician*, 86(3), 244–251.

36. Guo, S.; Dipietro, S.S. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. v. 89, n.3, p.219-229, 2010.
37. Goldberg, M. T. et al., (2007). TNF- α Suppresses α -Smooth Muscle Actin Expression in Human Dermal Fibroblasts: An Implication for Abnormal Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* (2007) 127, 2645–2655.
38. Haase, I.; Evans, R, Pofahl; Watt, F. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3227–3238
39. Hayat N.Q. et al. Effect of methimazole-induced hypothyroidism on Histological characteristics of parotid gland of Albino rat. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. v.22, n.3, p-22-27, 2010.
40. Hayat, N. Q., Nadir, S., & Muneera, M. J. (2016). The Effect of Hypothyroidism on the Body Weight of Adult Albino Wistar Rats. *Journal of Rawalpindi Medical College (JRMC)*, 20(2), 147–149.
41. Hawkins, D.; Abrahamse, H (2006). Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. *Photomedicine and Laser Surgery*. 24 (6), p.705–714.
42. Hinz, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology*. v.127, p- 526–537, 2007.
43. Iwano M. et al., (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis, *J. Clin. Invest.* 110:341–350.
44. Jenkins, P.A.; Carroll, J.D. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/ Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.29, n.12, p.785-787, 2011.
45. Jongh, R. T. et al., (2011). Endogenous subclinical thyroid disorders, physical and cognitive function, depression, and mortality in older individuals. *European Journal of Endocrinology* (2011) 165 545–554
46. Labat-Robert. Cell–Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathologie Biologie*. 2012; 60: 15–19.
47. Liem, P. H et al., (2013). Treating a collagen scaffold with a low concentration of nicotine promoted angiogenesis and wound healing. *Journal of Surgical Research*, 182(2), 353–361
48. Lenselink EA (2015). Role of fibronectin in normal wound healing. *Int Wound J*, 12:313–316

49. Kibe, T., et al., (2017). Examination of the early wound healing process under different wound dressing conditions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123(3), 310–319.
50. Konstantinos. E. A., & Zografos, G. C. (2006). A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. *World Journal of Gastroenterology*, 12(17), 2721–2729.
51. Kusewitt, D. F et al.. (2009). Slug/Snai2 is a downstream mediator of epidermal growth factor receptor-stimulated reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 491–495.
52. Karu, T.J (1983). Stimulation of E. coli Growth by Laser and Incoherent Red Light. *Il Nuovo Cimento*. v.2, n.4, p.1138-1143.
53. Karu, T.I (1989). Photobiology of Low-Power Laser Effects. *Health Physics*. v.56, n.5, p.691-704.
54. Karu, T.I. et al (2005). Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*. v. 81, p. 98-106.
55. Klingberg F., Hinz, B., White, ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *Journal of Pathology*; 229: 298–309, 2013
56. Kimura, Y. et al (2000). Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *Journal Clinical Periodontology*. v.27, p.715-721.
57. Kim, K. I., et al. (2013). Recombinant human epidermal growth factor on oral mucositis induced by intensive chemotherapy with stem cell transplantation. *American Journal of Hematology*, 88(2), 107–112.
58. Kilik, R. Et al., (2010). Effects of equal daily doses delivered by different power densities of low-level laser therapy at 670 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats: A brief report. *Lasers in Medical Science*, 25(5), 761–766.
59. Mendez, T.M.T.V. et al. Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v.22, n.1, p.19-25, 2004.
60. Mezzomo, T. R., & Nadal, J. (2016). Efeito Dos Nutrientes E Substâncias Alimentares Na Função Tireoidiana E No Hipotireoidismo. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 11(2), 427–444.

61. Mester, E. et al. Effect of Laser Rays on Wound Healing. *The American Journal of Surgery*. v.122, p.532-535, 1971
62. Monaco, J. L.; Lawrence, W.T. Acute wound healing: An overview. *Clinics in Plastic Surgery*. v.30, p.1-12, 2003.
63. Mendonça, R.J.; Coutinho-Neto, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.84, n.3, p.257-62, 2009.
64. Midwood, K.S.; Willians, L.V.; Schwarzbauer, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *IJBCB*. v.36, p-1031-1037, 2004.
65. Miller, M.C.; Agrawal, A. Hypothyroidism in postradiation head and neck cancer patients: incidence, complications, and management. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. v.17. p:111–115, 2009.
66. Marsili, A., Zavacki, A. M., Harney, J. W., & Larsen, P. R. (2011). Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: A update. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34(5), 395–407.
67. Maligieri, L. A. O et al. (2017). Differing energy densities with laser 670 nm InGaP controls inflammation and collagen reorganization in burns. *Burns*, 43(7), 1524–1531.
68. Moges, H. et al. Effect of 810 nm Light on Nerve Regeneration After Autograft Repair of Severely Injured Rat Median Nerve. *Lasers in Surgery and Medicine*. v.43, p.901-906, 2011.
69. Nagase, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, London, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006
70. Nassif, A.C.T. et al. Wound Healing in Colonic Anastomosis in Hypothyroidism. *Eur Surg Res*. v.42, p. 209–215, 2008.
71. Natori, J. Et al. The influence of hypothyroidism on wound healing. *J Nippon Med Sch*. v.66, n.3, p-176-180, 1999.
72. Patel, M. et al. (2013). Evaluation of acute physiological and molecular alterations in surgically developed hypothyroid Wistar rats. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(2), 110–115
73. Paraguassu, G.M. et al. Effect of laser phototherapy (λ 660nm), on type I and II collagen expression during wound healing in hypothyroid rats: Na Immunohistochemical study in a Rodent Model. *Photomedicine and Laser surgery*. v.32, n.5, p-281-88, 2014.

74. Pinheiro, A.L.B. et al. Biomodulative Effects of Visible and IR Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds of Nourished and Undernourished Wistar Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.27, n.6, p.947-957, 2009.
75. Pires-Oliveira, D.A.A. et al. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. *Osteoporosis International*. v.21, p.2109-2114, 2010.
76. Posten, W. et.al. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. *Dermatological Surgery*. v.31, p.334-340, 2005.
77. Rettinger, C. L., Fletcher, J. L., Carlsson, A. H., & Chan, R. K. (2017). Accelerated epithelialization and improved wound healing metrics in porcine full-thickness wounds transplanted with full-thickness skin micrografts. *Wound Repair and Regeneration*, 25(5), 816–827.
78. Ramalho LMP, Weyll BMP, Lino DMC et al (2010) Assessment of laser photobiomodulation and polarized light on the healing of cutaneous wounds on euthyroid and hypothyroid induced rats. *Proc SPIE* 7552.
79. Ribeiro, M.S. et al. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v.22, n.1, p. 59-66, 2009.
80. Ritchie, J. W. et al., (2003). A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(4), 653–661.
81. Safer, J. D. (2013). Thyroid Hormone and Wound Healing, 2013. *Journal of Thyroid Research*. v.2013, article ID 124538, 5pages.
82. Shen, C., Sun, L., Zhu, N., & Qi, F. (2017). Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(4), 949–959.
83. Slavkovsky, R. (2011). Zucker diabetic fatty rat: a new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 19(4), 515–525.
84. Schweinberger, M. H., & Roukis, T. S. (2009). Wound Complications. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 26(1), 1–10.
85. Sampaio, S. C. P. O. et al., (2013) Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and

- their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci* (2013) 28:799–806.
86. Santana, C. et al., (2015). Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PLoS ONE*, 10(4).
87. Sabol, F. et al., (2012). Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. *Veterinarni Medicina*, 57(2), 77–82.
88. Shefer, G. et al. Skeletal Muscle Cell Activation by Low-Energy Laser Irradiation: A Role for the MAPK/ERK Pathway. *Journal of Cellular Physiology*. v.187, p.73-80, 2001.
89. Silveira, P.C.L. et al (2011). Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers in Medical Science*. v.26, p.125-131.
90. Sousa, A.P.C et al., (2014). Infrared LED light therapy influences the expression of fibronectin and tenascin in skin wounds of malnourished rats—A preliminary study. *Acta Histochemica* v.116, p.1185–1191.
91. Tandara, A.A.; Mustoe, T.A (2004). Oxygen in Wound Healing - More than a Nutrient. *World Journal of Surgery*. v. 28, p. 294-300.
92. Tanzi, E.L.; Lupton, J.R.; Alster, T.S. Lasers in dermatology: Four decades of progress. *J Am Acad Dermatol*. v.49, p.1-31, 2003.
93. Viegas, V. N et al. (2007). Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory Reactions during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. *Photomedicine and Laser Surgery*, 25(6), 467–473.
94. Weber, J. B.B. et al (2006). Laser Therapy Improves Healing of Bone Defects Submitted to Autologous Bone Graft. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.24, n.1, p. 38-44.
95. Uzêda-e-Silva, V. D., et al., (2016). Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers in Medical Science*, 31(7), 1363–1370.
96. Uzêda e Silva, V. D. et al., (2017) Does laser phototherapy influence the proliferation of myoepithelial cells in the salivary gland of hypothyroid rats? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Volume 173, August 2017, Pages 681-685.

97. Usumez, A., Cengiz, B., Oztuzcu, S., Demir, T., Aras, M. H., & Gutknecht, N. (2014). Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers in Medical Science*, 29(6), 1807–1813.
98. Uchinaka, A. et al., (2017). Evaluation of dermal wound healing activity of synthetic peptide SVVYGLR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(3), 714–720.
101. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci* 18:95–99
102. Yong, A., & McNaught, C. E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (United Kingdom)*, 35(9), 473–477.
103. Westmuckett AD, Siefert JC, Tesiram YA, Pinson DM, Moore KL (2013) Salivary Gland Hypofunction in tyrosylprotein sulfotransferase-2 Knockout Mice Is Due to Primary Hypothyroidism. *PLoS ONE* 8(8): e71822, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071822>.
104. Walker, M. D. et al., (2000). Effect of Low-Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin. *Lasers in Surgery and Medicine* 26:41–44.
105. Wong-Riley, M.T.T. et al (2005). Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins.: Role of cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. v.280, n. 6, p. 4761-4771.
106. Widgerow, A.D. (2011). Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control *Wound Rep Reg* (2011) 19 117–133
107. Zimmermann, E., Ribas-Filho, J. M., Malafaia, O., Nassif, P. A. N., Stieven Filho, E., & Przysiezny, P. E. (2009). Tracheal suture in rats with hypothyroidism: wound healing study. *Acta Cirurgica Brasileira Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, 24(4), 282–289.
108. Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 510–525.

ANEXO A



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **079/2015**, intitulado **“IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DA FOTBIOMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE RATOS HIPOTIREOIDIANOS”**, sob a responsabilidade do Professora Doutora Luciana Maria Pedreira Ramalho, lotada na Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **17 de abril de 2015**.

Salvador, 17 de abril de 2015.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

Profª. Tânia Tavares Rodrigues
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

ANEXO B

Tabela 5. Análise semiquantitativa da reepitelização na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Reepitelização		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	50	50	-
	Eutireoidiano laser	33,3	66,7	-
	Hipotireoidiano controle	50	50	-
	Hipotireoidiano laser	-	100	-
7 dias	Eutireoidiano controle	-	100	-
	Eutireoidiano laser	-	100	-
	Hipotireoidiano controle	-	100	-
	Hipotireoidiano laser	-	100	-
14 dias	Eutireoidiano controle	-	16,7	83,3
	Eutireoidiano laser	-	33,3	66,7
	Hipotireoidiano controle	-	83,3	16,7
	Hipotireoidiano laser	-	83,3	16,7

Grupos entre os quais houve diferença

Tabela 6. Análise semiquantitativa da inflamação aguda na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Inflamação aguda		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	66,7	16,7	16,7
	Eutireoidiano laser	88,3	16,7	-
	Hipotireoidiano controle	50	33,3	16,7
	Hipotireoidiano laser	83,3	16,7	-
7 dias	Eutireoidiano controle	100	-	-
	Eutireoidiano laser	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano controle	100	-	-
	Hipotireoidiano laser	83,3	-	16,7
14 dias	Eutireoidiano controle	100	-	-
	Eutireoidiano laser	100	-	-
	Hipotireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano laser	100	-	-

Tabela 7. Análise semiquantitativa da inflamação crônica na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Inflamação crônica		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	33,3	50	16,7
	Eutireoidiano laser	16,7	66,7	16,7
	Hipotireoidiano controle	50	50	-
	Hipotireoidiano laser	50	50	-
7 dias	Eutireoidiano controle	-	83,3	16,7
	Eutireoidiano laser	-	100	-
	Hipotireoidiano controle	-	16,7	83,3
	Hipotireoidiano laser	-	66,7	33,3
14 dias	Eutireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Eutireoidiano laser	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano laser	50	50	-

Tabela 8. Análise semiquantitativa da angiogênese na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Angiogênese		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Eutireoidiano laser	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano controle	100	-	-
	Hipotireoidiano laser	100	-	-
7 dias	Eutireoidiano controle	-	83,3	16,7
	Eutireoidiano laser	33,3	50	16,7
	Hipotireoidiano controle	50	50	-
	Hipotireoidiano laser	50	-	-
14 dias	Eutireoidiano controle	33,3	66,7	-
	Eutireoidiano laser	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano laser	66,7	16,7	16,7

Tabela 9. Análise semiquantitativa da proliferação fibroblástica na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Fibroblastos		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Eutireoidiano laser	50	50	-
	Hipotireoidiano controle	100	-	-
	Hipotireoidiano laser	100	-	-
7 dias	Eutireoidiano controle	-	83,3	16,7
	Eutireoidiano laser	-	50	50
	Hipotireoidiano controle	33,3	33,3	33,3
	Hipotireoidiano laser	-	66,7	33,3
14 dias	Eutireoidiano controle	-	33,3	66,7
	Eutireoidiano laser	-	16,7	83,3
	Hipotireoidiano controle	-	50	50
	Hipotireoidiano laser	-	33,3	66,7

Tabela 10. Análise semiquantitativa da reepitelização na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Colágeno		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Eutireoidiano laser	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano controle	100	-	-
	Hipotireoidiano laser	100	-	-
7 dias	Eutireoidiano controle	50	50	-
	Eutireoidiano laser	33,3	66,7	-
	Hipotireoidiano controle	50	50	-
	Hipotireoidiano laser	-	50	50
14 dias	Eutireoidiano controle	-	33,3	66,7
	Eutireoidiano laser	-	16,7	83,3
	Hipotireoidiano controle	-	50	50
	Hipotireoidiano laser	-	16,7	83,3

Tabela 11. Análise semiquantitativa da imunexpressão do colágeno tipo I na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Colágeno I		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	-	100	-
	Eutireoidiano laser	33,3	66,7	-
	Hipotireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano laser	-	100	-
7 dias	Eutireoidiano controle	50	50	-
	Eutireoidiano laser	33,3	50	16,7
	Hipotireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano laser	33,3	66,7	-
14 dias	Eutireoidiano controle	-	100	-
	Eutireoidiano laser	-	66,7	33,3
	Hipotireoidiano controle	50	33,3	16,7
	Hipotireoidiano laser	16,7	33,3	50

Tabela 12. Análise semiquantitativa da imunexpressão do colágeno tipo III na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Colágeno III		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	50	33,3	16,7
	Eutireoidiano laser	-	66,7	33,3
	Hipotireoidiano controle	-	33,3	66,7
	Hipotireoidiano laser	-	-	100
7 dias	Eutireoidiano controle	33,3	33,3	33,3
	Eutireoidiano laser	33,3	66,7	-
	Hipotireoidiano controle	83,3	16,7	-
	Hipotireoidiano laser	16,7	50	33,3
14 dias	Eutireoidiano controle	66,7	16,7	16,7
	Eutireoidiano laser	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano controle	16,7	33,3	50
	Hipotireoidiano laser	66,7	33,3	-

Tabela 13. Análise semiquantitativa da imunexpressão da fibronectina na área da ferida de acordo com o número e porcentagem dos espécimes por categoria.

Período experimental	Grupos	Fibronectina		
		Discreta %	Moderada %	Intensa %
3 dias	Eutireoidiano controle	-	33,3	66,7
	Eutireoidiano laser	-	-	100
	Hipotireoidiano controle	-	-	100
	Hipotireoidiano laser	-	16,7	83,3
7 dias	Eutireoidiano controle	50	33,3	16,7
	Eutireoidiano laser	33,3	16,7	50
	Hipotireoidiano controle	-	16,7	83,3
	Hipotireoidiano laser	33,3	50	16,7
14 dias	Eutireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Eutireoidiano laser	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano controle	66,7	33,3	-
	Hipotireoidiano laser	16,7	66,7	16,7