MAYRA TORRES VASQUES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO EM ÚLCERA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE E TRATADA
COM LASER DE DIODO**

São Paulo

2009

Mayra Torres Vasques

**Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico em
úlceras induzidas experimentalmente e tratada com laser de diodo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Correa

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vasques MT. Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico em úlcera induzida experimentalmente e tratada com laser de diodo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a) Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a) Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a) Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fatima e João, pelo amor incondicional, pela dedicação à minha formação e por compartilhar comigo a imensa alegria por cada conquista. Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Aos meus irmãos Alexandre e Fernando, por serem sempre um exemplo de vida e meu apoio para vencer os obstáculos. Amo vocês.

Minhas cunhadas Cíntia e Adriana, pelo apoio e pelo carinho comigo, com meus irmãos e minha família.

Meu sobrinho Rodrigo, compartilhar de sua alegria, suas descobertas, sua inteligência, faz cada momento que passamos juntos, ser inesquecível.

À minha avó Guiomar, segunda mãe, sempre carinhosa e preocupada comigo, me ajuda a superar os momentos difíceis e divide as alegrias comigo.

Aos meus tios Luciano, Antonio, Maria Eliza e Tania. Obrigada por sempre acreditarem na minha capacidade e apostarem no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Luciana Correa , que soube transformar esse trabalho numa agradável e riquíssima experiência para mim. Cumpriu com excelência seu papel de orientadora, de colega de trabalho e de amiga. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Moacyr Domingos Novelli, meu eterno mestre. Certamente a pessoa com a visão mais genial da vida que eu conheço, É incrível poder dividir idéias e projetos (e algumas coca-colas) com você.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, à Profa. Dra. Ana Cecília C. Aranha e à Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas. Obrigada por abrir as portas do Lelo, incentivar a busca por conhecimentos na área do laser e serem grandes exemplos de profissionais.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, Profa. Dra. Marina Helena C. G. de Magalhães, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr., Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Profa. Dra. Andrea Mantesso, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, Profa. Dra. Karem Lopez Ortega.

Aos colegas de pós-graduação. Agradeço o apoio e desejo sucesso a todos.

Agradecimento especial ao meu colega de pós-graduação e grande amigo Marco Aurélio Verlangieri Alves (Magá). Você foi uma ótima surpresa da pós-graduação e sabe que não é exagero dizer quem sem você este trabalho não seria possível. Este trabalho é nosso. Obrigada por sua dedicação e por sua amizade. Conte comigo sempre.

A Profa. Dra. Denise Maria Zezell e à aluna de pós-graduação do IPEN Carolina Benetti. Muito obrigada pela dedicação e apoio à esta pesquisa.

Aos meus amigos pelo carinho e por dividirem os melhores e os piores momentos da vida comigo. Em especial à Renata, Luis, Felipe e Margarita, o apoio e a amizade de vocês sempre serão imprescindíveis.

A minha amiga Melanie Khouri, por dividir comigo os principais momentos e dificuldades da vida profissional. Somente nós sabemos os obstáculos que estamos ultrapassando. Obrigada pela força.

Às minhas colegas do Lelo (Margarita, Maria Helena, Leila, Lia, Daiane), são incontáveis as vezes que vocês me deram forças e incentivos para continuar. Obrigada por acreditar em mim sempre.

Às funcionários da disciplina de Patologia Bucal: Elisa, Bia, Zilda, Néia e Nair e ao funcionário da disciplina de Patologia Geral José Carlos.

Às funcionárias do Lelo: Lili, Ge, Patricia e Jo.

Ao Lelo (Laboratório Especial de Laser em Odontologia da Faculdade de Odontologia da USP), pelo empréstimo dos equipamentos para a pesquisa.

Ao Centro de Laser e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), pelo trabalho de análise de temperatura.

Ao Laboratório Experimental da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FOUSP.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Vasques MT. Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico em úlcera induzida experimentalmente e tratada com laser de diodo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas presentes nas células em condições normais e supra-expressadas em condições de estresse e choque térmico. O laser de diodo tem sido utilizado em diversos tratamentos na odontologia, dentre eles na atenuação de sintomas e na aceleração do reparo de úlceras traumáticas. O objetivo deste estudo foi verificar, através de análise imunoistoquímica da expressão das HSPs (Hsp27 e Hsp 47) e da medição de temperatura por intermédio de câmera termográfica, se o laser de diodo modifica, (e quanto modifica) a temperatura local, bem como se há alteração no padrão de expressão das proteínas citadas em três regiões distintas do fragmento analisado. Para este estudo, foram feitos testes *in vitro* e *in vivo*. Para os testes *in vivo*, foram utilizados 56 ratos, nos quais foi induzida úlcera em ventre lingual. Os animais foram divididos em 4 grupos: **GL** - grupo ulcerado com posterior irradiação com laser (parâmetros: laser diodo, 0,5 W de potência, pulsado (10 Hz), por 40 segundos (método varredura), 80J/cm² de energia total (área de 0,25cm²) Má, e a energia por ponto?); **GN** - grupo ulcerado sem nenhum tratamento posterior; **CP** - grupo controle sem úlcera e irradiado com laser (mesmos parâmetros de GL); e **CN** - grupo

controle sem úlcera e sem nenhum tratamento posterior. O teste *in vitro* foi destinado à medição da temperatura durante a irradiação laser, quando utilizaram-se línguas de ratos previamente ulceradas e extirpadas, as quais foram irradiadas com os parâmetros para o teste *in vivo*. Na superfície irradiada, houve aumento médio de temperatura em torno de 6,7°C e, na região mais distante dessa superfície, de 2,7°C. Na análise semiquantitativa da expressão imunoistoquímica da Hsp27, observou-se padrão de marcação mais intenso em GL comparando-se a GN e aos demais grupos. Na análise quantitativa da Hsp47, houve maior quantidade de células positivas no GL em relação aos demais grupos, principalmente nas regiões mais próximas da superfície irradiada. Concluiu-se que a irradiação laser provocou aumento de temperatura local, bem como desencadeou padrões de intensidade maiores e diferentes da Hsp27 e da Hsp47 em relação aos demais grupos. Isso indica que o tecido irradiado sofreu maior estresse celular, com resposta tecidual de intensa migração e diferenciação celular, bem como de maior síntese colagênica.

Palavras-chave: Laser de diodo, Proteína de choque térmico, Úlcera bucal, Hsp27, Hsp47.

Vasques MT. Immunohistochemical expression of heat shock protein in induced ulcers treated with diode laser [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Heat shock proteins (HSPs) are proteins present in cells under normal conditions and over-expressed in terms of stress and thermal shock. The laser diode has been used in various treatments in dentistry, to reduce symptoms and accelerate the repair of traumatic ulcers. The aim of this study was to verify, by means of immunohistochemical expression analysis of HSPs (Hsp27 and Hsp 47) and temperature measurement using a thermographic camera, whether diode laser changes the local temperature (and how much the temperature changes), and whether there is a change in expression pattern of the above-mentioned protein in three distinct regions of the analyzed fragment. For this study, some of the tests were conducted *in vitro* and others *in vivo*. For the *in vivo* tests, 56 rats were used, in which ulcers were induced on the ventral surface of the tongue. The animals were divided into 4 groups: **GL**-group with ulcer and later laser irradiation (diode laser parameters: 0.5 W power, pulsed (10 Hz), for 40 seconds (defocused), 80J/cm² total power in area (0.25cm²) **GN**- group with ulcer and without any further processing; **CP**- control group without ulcer and with laser irradiation (same parameters as in GL); and **GN**-control group without ulcer and without any further processing. The *in vitro* tests were conducted to measure temperature during laser irradiation, using the tongues that had previously been ulcerated in rats, and later removed and irradiated

with the same parameters as those used for the *in vivo* test. In the irradiated surface, there was an increase in mean temperature of around 6.7°C, and in the region more distant from this surface, an increase of 2.7 °C. In the semi-quantitative analysis of immunohistochemical expression of Hsp27, greater expression of Hsp27 was shown in GL in comparison with the other groups in general. In quantitative analysis of Hsp47, there was a larger quantity of positive cells in GL, when compared with the other groups, particularly in the regions closest to irradiated surface. It was concluded that the irradiation laser caused local temperature increase, and also set off greater and different patterns of intensity of Hsp27 and Hsp47, in comparison with those of the other groups. This indicates that the irradiated tissue suffered higher cellular stress, with tissue response of intense migration and cell differentiation, as well as increased collagen synthesis.

Keywords: Diode laser, Heat shock protein, Oral ulcer, Hsp47, Hsp27.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1	Indução da úlcera.....	44
Figura 4.2	Úlcera formada após 24h da indução(a) e aplicação do laser de diodo (b).....	45
Figura 4.3	Áreas de análise histomorfométrica quantitativa.....	49
Figura 4.4	Visão lateral da língua em corte longitudinal com os pontos de análise de temperatura.....	51
Figura 5.1	Marcação Hsp27 (tempos experimentais 0h a 72h).....	58
Figura 5.2	Marcação Hsp47 (tempos experimentais 0h a 72h).....	62
Figura 5.3	Marcação Hsp27 e Hsp 47 (tempo experimental 120h).....	63
Figura 5.4	Exemplo de padrão de marcação positiva na área mais distante da úlcera.....	67
Gráfico 5.1	Temperatura para diferentes profundidades em função do tempo. Curva de variação para um espécime a título de exemplo.....	52
Gráfico 5.2	Média do número de células positivas para Hsp47 nos grupos controles sem lesão/com laser e sem lesão/sem laser.....	64
Gráfico 5.3	Média do número de células positivas para Hsp47 na região A.....	65
Gráfico 5.4	Média do número de células positivas para Hsp47 na região B.....	66
Gráfico 5.5	Média do número de células positivas para Hsp47 na Região C.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Classificação das HSPs.....	21
Tabela 5.1	Médias da variação de temperatura (°C) e incertezas (erro-padrão) obtidas em diferentes profundidades da língua durante a irradiação com o laser de diodo.....	53
Tabela 5.2	Gradação dos elementos teciduais indicativos do processo reparativo nas úlceras linguais em função dos grupos e tempos experimentais.....	54
Tabela 5.3	Gradação da expressão imunoistoquímica da Hsp27 em elementos teciduais localizados na região próxima à úlcera (região A).....	56
Tabela 5.4	Gradação da expressão imunoistoquímica da Hsp47 em elementos teciduais localizados na região próxima à úlcera (região A).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
CLA	Centro de Laser e Aplicações
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO ₂	Dióxido de carbono
EB	Estreptavidina-biotina
EPI	Equipamento de Proteção Individual
Er:YAG	matriz hospedeira YAG dopada de Érbio
FOUSP	Faculdade de Odontologia da USP
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
GaAs	Arseneto de gálio
H.pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HE	Hematoxilina-eosina
Ho:YAG	matriz hospedeira YAG dopada de Holmio
HSP	Heat Shock Protein
IL-10	Interleucina 10
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Lelo	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
Nd:YAG	matriz hospedeira YAG dopada de Neodímio
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio

sHSP	Small Heat Shock Protein
USP	Universidade de São Paulo
UVA/ UVB	ultravioleta A e B
USA	United States of America
UK	United Kingdom
YAG	<i>Yttrium Aluminium Garnet</i> (granada de ítrio e alumínio)

LISTA DE SÍMBOLOS

h	Hora
s	Segundos
MS	Milisegundo
t	Tempo
J	Joule
mJ	Milijoule
J/cm ²	Joule, dividido por centímetro quadrado
KDa	Kilodalton
°C	Graus Celsius
W	Watt
mW	Miliwatt
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
Hz	Hertz
p	Significância
ml	Mililitro
=	Igual
n°	Número
+/-	Mais ou menos

<

menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3	PROPOSIÇÃO.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
5	RESULTADOS.....	52
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXOS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) foi concebido em 1960 por Theodor Maimann e desde então tem se disseminado na área médica e odontológica, por seus benefícios terapêuticos. O laser de diodo emite radiação infravermelha na faixa entre 780 e 960 nm com potência que varia a partir de 1mW podendo ultrapassar os 10W. Na faixa entre 1 e 500mW, ele atua como um laser de baixa potência com fins terapêuticos, alterando o comportamento celular na ausência de aquecimento, resultando em efeitos de analgesia, ação antiinflamatória e acelerando o processo de cicatrização de feridas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). A partir de 500mW atua para fins cirúrgicos através do calor gerado, com energia suficiente para incisar, vaporizar e coagular tecidos moles, bem como gerar dissipação térmica danosa às células (podendo causar denaturação protéica e necrose térmica) (CHOW; BARNSELEY, 2005; GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Na reparação tecidual a comparação entre os processos inflamatórios e reparativos entre incisões realizadas com laser de diodo e com bisturi convencional revela que ambos os métodos promovem uma restituição arquitetônica do tecido, caracterizada principalmente pela rápida reorganização do componente vascular e pelo progressivo desaparecimento das células inflamatórias (AZEVEDO et al., 2006). As diferenças residem principalmente no maior grau de denaturação protéica, de necrose e de carbonização tecidual gerado pelo laser de diodo em relação ao bisturi convencional, danos que aumentam à medida que se aumenta a energia do feixe laser. Apesar de

vários trabalhos atualmente analisarem as características inflamatórias e reparativas dos tecidos submetidos à ação do laser (KARU et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; REZENDE et al., 2007), a amplitude e as repercussões do dano térmico geradas pelo laser ainda precisam ser esclarecidas. Nesse sentido, o estudo dos mecanismos de defesa, acionados pela célula diante de situações do choque térmico provocado pelo feixe laser, podem elucidar alguns fenômenos cruciais para o processo reparativo, dentre eles o aumento da expressão das proteínas de choque térmico e a interação entre o tecido conjuntivo e o epitelial no processo reparativo.

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP) constituem parte do grupo das chaperonas que são expressas intracelularmente em condições normais e, em situações de choque térmico, apresentam aumento de sua expressão (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004). Atribui-se a essa família função citoprotetora por intermédio da mudança conformacional de outras proteínas, reunião de multicomplexos protéicos, termotolerância e anulação de mutações, prevenindo a agregação protéica, bem como contribuindo para nova síntese de proteínas (LAPLANTE et al., 1998).

A proposta deste trabalho é analisar a expressão imunoistoquímica de duas proteínas de choque térmico de família e peso molecular distintos, em tecidos previamente ulcerados e tratados com laser de diodo com potência de 0,5W.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP)

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP) constituem parte do grupo das chaperonas que são expressas intracelularmente em condições normais e, em situações de choque térmico, apresentam aumento de sua expressão (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004). Atribui-se a essa família função citoprotetora por intermédio da mudança conformacional de outras proteínas, reunião de multicomplexos protéicos, termotolerância e anulação de mutações, prevenindo a agregação protéica, bem como contribuindo para nova síntese de proteínas. Elas atuam no processo de transformação tridimensional da proteína (denominado enrolamento ou enovelamento) por duas vias distintas: por intermédio do “abraçamento” da proteína nascente imediatamente ou não após à sua síntese ribossômica (por exemplo, Hsp70), ou pela criação de microcompartimentos nos quais as proteínas recém-formadas e disponíveis no citossol são capturadas e enroladas (nas chamadas chaperoninas, por exemplo, a Hsp60) (HARTL; HAYER-HARTL, 2002).

Outras situações de estresse podem também provocar aumento da expressão das HSP, tais como privação de glicose, contato com toxinas bacterianas e com metais pesados, estresse oxidativo e situações de reparação tecidual, na qual há grande atividade de proliferação e diferenciação celular (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004).

São classificadas (Tabela 2.1) de acordo com o tamanho (massa molecular) e da função da proteína analisada.

Tabela 2.1 – Classificação das HSPs¹

Peso molecular aproximado (kDa)	Proteína na célula eucariótica	Função
10	Hsp10	Co-fator da Hsp60
20-30	Grupo HspB. São dez membros nos mamíferos, incluindo Hsp27 e HspB1	Modulação da dinâmica da actina do citoesqueleto
40	Hsp40	Atuação em conjunto com Hsp70, prevenindo a agregação de proteínas nativas e apresentando-as a Hsp70 para enrolamento
60	Hsp60 (chaperonina)	ATPase; promoção de dobramentos eficientes; formação de tetradecâmeros quando na presença de ATP e Hsp10; encontrada nas mitocôndrias ou no citosol; dobramento de actina e tubulina (chaperonina)
70	Grupo HspA, incluindo Hsp71, Hsc70 (ou Hsp73), Hsp70 citosólico (ou Hsp72), Hsp70 mitocondrial, GRP78 (BiP – do retículo endoplasmático) e Hsx70 (encontrada somente em primatas)	ATPase; estabilização de proteínas previamente ao dobramento; transporte através de membranas; proteólise; associação ao p53 no citosol e a cadeias pesadas de imunoglobulinas; no citosol; termotolerância
90	Grupo HspC, incluindo Hsp90 (mitocondrial, citosólica ou do retículo endoplasmático) e grp94 (proteína reguladora de glicose)	Estabilização de proteínas previamente ao completo dobramento ou ativação; formação de complexos estáveis com receptores glicorticóides inativos e com outros fatores de transcrição
100	Hsp104, Hsp110	ATPase, facilitação da proteólise; tolerância a temperaturas extremas

¹ Adaptado de Landry et al. (1989); informações complementares de Tsan, Gao (2004)

2.1.1 Hsp 27

A Hsp27, com peso molecular de 27KDa, pertence à família das pequenas proteínas de choque térmico (sHSP). Sua síntese é induzida transitoriamente em resposta a estresse celular e a uma grande variedade de estímulos físicos, químicos e biológicos, incluindo o calor e o estresse oxidativo (ARRIGO et al., 2005; CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003).

Em células sob condições normais (sem estresse), os níveis de Hsp27 são relativamente baixos; apresentando-se predominantemente como grandes unidades oligoméricas de até 800 KDa. Durante a resposta ao estresse, o aumento do nível de Hsp27 é precedido de uma reorganização desse status oligomérico para um status monomérico (27KDa), induzida por fosforilação. A Hsp27 pode ser fosforilada pela MAPKAP2 e 3 e pela isoforma delta da proteína C quinase. O aumento da fosforilação da Hsp27 é detectado minutos após o estresse celular seguido pelo aumento dos níveis de expressão da proteína por várias horas. Em geral essa indução é transitória e a proteína retorna aos níveis basais após a remoção do agente estressante (CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003).

A Hsp 27 é expressa no epitélio, sob condições normais, nas diversas camadas (aumentando sua expressão, quanto maior for a diferenciação celular). Durante a reepitelização de feridas, expressa-se mais especificamente na camada basal (MONASTIRLI et al., 2005).

Alguns autores estudaram o papel da Hsp27 na termotolerância de células e nos tecidos (ARRIGO, 2001; LANDRY et al., 1989, SAMALI et al., 2001). Segundo Landry et al. (1989), evidências experimentais, através da transfecção (inserção de fragmento de DNA de um tipo de célula ou organismo em outro) de Hsp27 humana em hamsters chineses, estabeleceram a relação entre a presença da Hsp27 e a termotolerância. Nesse experimento, foi realizada a cultura de células de hamsters modificadas para produzir Hsp27 humana e a cultura de células de hamster não-modificadas. As células foram submetidas a tratamento com banhos térmicos à 43°C e, a seguir, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio apropriado para o crescimento da cultura. Para determinar o grau de sobrevivência dessas células contou-se o número de colônias com mais de 50 células (8 a 10 dias após o início da cultura) e compararam-se os grupos. As células modificadas apresentaram maior expressão da Hsp27 e maior termorresistência, levando os autores a concluir que a termorresistência está ligada à expressão da Hsp27.

Ainda quanto ao efeito de termotolerância, Trautinger et al. (1997) relatou que a presença de Hsp27 leva à termotolerância em situações de queimaduras solares por radiações UVA e UVB, devido à sua interação com o calor.

A Hsp27 foi descrita por Bruey et al. em 2000 e por Concannon, Gorman e Samali em 2003, como um inibidor molecular da apoptose, propriedade que contribui para sua característica citoprotetora. A Hsp27 liga-se ao citocromo c liberado da mitocôndria, evitando a ativação da cascata da apoptose da procaspase 9.

Samali et al. (2001) realizaram cultura de células, submeteram-nas à choque térmico e realizaram análise da Hsp27, Hsp72, citocromo c e caspase-3 através da técnica de Westernblot. Concluíram que há inibição da apoptose durante a termotolerância, na qual a Hsp27 preferencialmente bloqueia a ação do citocromo c liberado das mitocôndrias.

Além do papel de inibidora molecular da apoptose, a Hsp27 desempenha a função de proteção das fibras de actina (EBERT et al., 2005).

Hirano, Shelden e Gilmont (2004), através de seu trabalho com cultura de células, mostraram que a supra-expressão de Hsp27 está ligada à maior contração da matriz extracelular e a sub-expressão dessa proteína está relacionada à menor contração da matriz extracelular durante o processo reparativo. Relacionaram fibroblastos mais alongados e maior adesão destes com a matriz à maior expressão de Hsp27 no tecido, resultando em maior contração da matriz. Hirano, Shelden e Gilmont (2004), concluíram também que os fibroblastos que supra-expressam Hsp27 migram mais rapidamente.

Piotrowicz, Hickey e Levin (1998) verificaram a migração de células endoteliais após a realização de corte linear em cultura de células confluentes. Compararam células bovinas normais, células bovinas com supra-expressão de Hsp27 (*wild-type*) e células bovinas com sub-expressão da Hsp27 (mutadas). Obtiveram como resultado que as células *wild-type* tiveram maior migração em comparação às células controle e mutadas. Verificaram também que as células *wild-type* apresentavam maior quantidade

de Hsp27 fosforilada e que esse fator estava envolvido positivamente com a maior migração celular dessas células.

Hirano, Shelden e Gilmont (2004) e Mounier e Arrigo (2002), afirmaram que a polimerização da actina e a oligomerização das HSPs são processos altamente dinâmicos que estão interligados em algum ponto. Algumas HSPs de baixo peso molecular, como a Hsp27, interagem com o citoesqueleto de actina de duas formas: a primeira como uma proteína de nivelamento, quando apresentada na forma não-fosforilada e monomérica, e a segunda como uma proteína estabilizadora do filamento de actina, quando organizada na forma fosforilada e oligomérica.

Alguns estudos tentam relacionar a expressão da Hsp27 com o grau de diferenciação dos queratinócitos. Monastirli et al. (2005) demonstraram, através de estudo imunoistoquímico em fetos humanos (em diversos períodos gestacionais) e em adultos, que o início da expressão da Hsp27 no epitélio da pele se dá simultaneamente ao início da estratificação epitelial (9 semanas gestacionais). A alteração da expressão nas camadas do epitélio em fases posteriores do período pré-natal e pós-natal sugere que Hsp27 pode estar envolvida em eventos determinantes da morfogênese epidermal em humanos. A partir da 23^a semana gestacional até a idade adulta, os autores não encontraram imunoexpressão da Hsp27 na camada córnea; uma expressão moderada a forte foi encontrada na camada granulosa; na camada espinhosa foi observada expressão fraca e, na camada basal, a imunoexpressão foi negativa na maioria dos espécimes. Os autores verificaram que a intensidade da expressão da Hsp27 no epitélio humano em desenvolvimento aumenta conforme aumenta a distância dos

queratinócitos da camada basal. Isso pode ser relacionado ao estado de diferenciação do queratinócito (MONASTIRLI et al., 2005).

2.1.2 Hsp47

Em 1986, foi descoberta uma proteína de peso molecular 47KDa que tinha sua expressão aumentada em situação de choque térmico, sendo então denominada *heat shock protein 47* (Hsp47). Pertence à superfamília *serpin* (protease inibidora de serina), mas não tem atividade inibidora de protease (NAGATA, 1998).

A Hsp47 é uma proteína residente no retículo endoplasmático das células, sendo associada ao colágeno e induzida por calor nos fibroblastos. É caracterizada não só pela especificidade do substrato a que se liga, o colágeno e o pró-colágeno, como também por sua correlação a vários tipos de colágeno na derme sob algumas condições patofisiológicas, como fibrose (NAGATA, 1998; TASAB; BATTEN; BULLEID, 2000). Também há expressão de Hsp47 em várias células que produzem colágeno e tecidos, sob condições normais (sem estresse), como os condrócitos, ossos, tendão, sangue, endotélio (NAGATA, 1998).

Imediatamente após a cadeia α de o procolágeno entrar no retículo endoplasmático, há ligação da Hsp47 a essa cadeia até o início do processo de trimerização, preservando a estrutura do procolágeno e prevenindo seu enrolamento ou a formação de agregados aleatórios, exercendo assim uma função de chaperona

molecular (NAGATA, 1998; SATOH et al., 1996, TASAB; BATTEN; BULLEID, 2000). A Hsp47 liga-se também à tripla hélice do colágeno maduro, dissociando-se apenas quando essa molécula entra no complexo de Golgi (NAGATA, 1998).

Em alguns casos de estresse celular, a Hsp47 é liberada no meio extracelular ligada ao procolágeno. A Hsp47 liga-se a tripla hélice de pró-colágeno assim como à fibra colágena madura e, em situações de estresse celular, mantém-se ligada ao pró-colágeno secretado, evitando que este forme emaranhado com as células (NAGATA, 1998). Em outros casos está relacionada à liberação de osteonectina para a matriz extracelular, envolvendo a migração celular dos queratinócitos. Kudo et al. (1994) verificaram que culturas de células de queratinócitos expressaram concomitantemente Hsp47 e osteonectina após serem expostas à estresse celular (redução da nutrição e estresse térmico).

A Hsp47 é uma proteína de choque térmico e, portanto, sua expressão é drasticamente aumentada após a manutenção das células em alta temperatura (42 a 45°C) por um curto período de tempo (NAGATA, 1998). Análise da atividade celular nuclear de um embrião de galinha demonstrou o aumento da taxa de transcrição de Hsp47 em 10 vezes após 2 horas de tratamento térmico a 45°C, taxa reduzida rapidamente a níveis basais durante período de recuperação mantido a 37°C (NAGATA, 1998).

Em situação de choque térmico a Hsp47 não se dissocia do procolágeno por 2 horas, enquanto em situações normais (sem estresse), o tempo de dissociação é de 15 a 20 minutos, sugerindo um mecanismo de controle de qualidade durante a síntese

colagênica (NAGATA, 1998). Esta, porém, decai sob condições de choque térmico, assim como ocorre com muitas outras proteínas, enquanto a síntese de Hsp47 mantém-se alta nessas condições (NAGATA, 1998, SATOH et al., 1996).

2.1.3 HSP e processos reparativos

É sabido que a HSP tem sua expressão aumentada em processos normais reparativos e diminuída em processos reparativos crônicos (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004;). Sua ação na célula facilita a proliferação em certas condições de reparo ao atuar na manutenção da fase correta do ciclo celular e do estágio de desenvolvimento celular (PECHAN, 1991).

Num estudo comparativo entre diversos tratamentos para a reparação tecidual, Verrico, Haylett e Moore (2001) verificaram que o único tratamento que não resultou em aumento da expressão de Hsp47 foi também o único tratamento que não apresentou características de fibrose no tecido, levando-o a sugerir que a expressão de Hsp47 pode ser um marcador de potencial para a resposta de fibrose.

Outras linhas de pesquisa têm evidenciado que a administração exógena da HSP, principalmente da HSP70, e a manutenção dessas proteínas no meio extracelular também exercem efeito benéfico sob o processo reparativo, ativando elementos

celulares importantes, tais como macrófagos, o que promove a eliminação rápida de debris e de tecido necrótico (KOVALCHIN et al., 2006).

Em úlceras do trato digestivo, o efeito citoprotetor das HSP tem sido estudado nas úlceras pépticas em relação à agressão por *H. pylori*. Segundo Yeo et al. (2004), a agressão por *H. pylori* leva a um decréscimo na expressão da HSP70, facilitando a formação de úlceras gástricas, porém, quando há estímulo da produção de HSP70 (por uma substância chamada Geranylgeranylacetone) a mucosa torna-se mais resistente à formação de úlceras induzidas por *H. pylori*.

Tsukimi et al. (2001) induziram úlceras estomacais por intermédio da introdução de ácido acético no lúmen gástrico de ratos, e verificaram a expressão quantitativa da Hsc70, Hsp70 e Hsp47, analisando os marcadores na situação sem úlcera, com úlcera, com o uso de medicação protetora gástrica (omeprazol) e com o uso de anti-inflamatórios (do tipo que causa irritação gástrica). Os autores concluíram que o aumento da expressão da Hsp70 observado no experimento esteve relacionado aos mecanismos de reparo da úlcera, estando supra-expressado nas situações com úlcera e com omeprazol (que acelera a cicatrização). Nos momentos iniciais da reparação, a alta expressão de Hsp47 foi associada à maior síntese colagênica. Um pequeno declínio no momento de reparação e remodelamento tardio foi também observado, porém com expressão superior ao tecido sem úlcera. Na situação de uso de anti-inflamatório houve retardo da cicatrização e manutenção da alta expressão de Hsp27 em períodos mais tardios (7º dia em diante). Os autores relacionaram esse fator à presença de características de fibrose nas úlceras com a cicatrização retardada pelo medicamento, devido ao alto grau de deposição de colágeno nessas situações.

Durante o reparo de úlceras gástricas, Tsukimi e Okabe (2001) observaram expressão da Hsp47 na base da úlcera no momento do desenvolvimento desta; houve redução dessa expressão com a cicatrização, seguida de um pico alto de expressão no período de 14 dias após a ulceração. Esse fenômeno sugere que a Hsp47 pode estar envolvida tanto na fase de síntese colagênica quanto na fase de remodelamento da cicatriz.

Em úlceras gástricas, Ebert et al. (2005) realizaram a análise de um acervo de biópsias de humanos e notaram que, nas lesões em fase de cicatrização, há forte expressão da Hsp27 na base e na margem da úlcera e em células endoteliais, fibroblastos e no tecido de granulação (somente nas áreas próximas à úlcera). Realizando experimento em ratos, ratos mutados que apresentavam supra-expressão de Hsp27, a expressão da Hsp27 foi mais forte em úlceras crônicas do que em úlceras recém-formadas, mostrando estar envolvida no processo de reparação das úlceras crônicas. O experimento mostrou também que a presença de maior quantidade de Hsp27 nos ratos mutados retardou a formação de úlcera induzida por antiinflamatório não-esteroidal, indicando que a expressão de Hsp27 é crítica para a proteção da mucosa do estômago.

Em úlceras bucais, a influência da HSP tem sido verificada principalmente nas lesões ulcerativas recorrentes; há evidencia de que a Hsp65 tenha participação na patogenia dessas lesões, na qual haveria uma reação cruzada caracterizada pelo reconhecimento do antígeno Hsp65 estreptocócico pelo sistema imunológico e sua posterior reação com antígenos semelhantes nas células epiteliais mediada por células de Langerhans (SHINNICK, 1991).

Miyamoto et al. (2008) observaram haver expressão da Hsp27 limitada às células epiteliais e interleucina 10 (IL-10) limitada às células da lâmina própria em úlceras aftosas recorrentes de pacientes submetidos a biópsias (material de acervo). O tecido sem úlcera (grupo controle) e o com hiperplasia fibrosa inflamatória apresentavam alta expressão da Hsp27, enquanto o tecido com úlcera aftosa recorrente apresentava baixa expressão. Os autores concluíram que a baixa expressão da Hsp27 pode estar relacionada à etiopatogenia da úlcera aftosa recorrente.

Segundo Laplante et al. (1998), em experimento no qual realizaram feridas cirúrgicas em pele de ratos e análises do dia 1 ao dia 21 após a realização das feridas, a Hsp27 é expressa principalmente pelos queratinócitos da camada suprabasal na epiderme normal e em regeneração, sendo uma expressão em queratinócitos em baixa proliferação e alta diferenciação. Porém, em algumas situações de estresse, esse experimento mostrou expressão da Hsp27 na camada basal da epiderme (menos diferenciada e mais proliferativa). Segundo o mesmo autor, a Hsp 27 está associada à regulação da polimerização da F-actina e da migração de queratinócitos, tendo função protetora contra fatores ambientais estressantes à ferida.

2.2 Laser e efeitos fototérmicos e fotoquímicos

A interação do laser com os tecidos biológicos se dá através de diversos fatores, como as propriedades ópticas do tecido e o comprimento de onda da luz laser. Após a

irradiação, parte da energia é absorvida, outra parte é espalhada e refletida e outra parte ainda é transmitida sem sofrer alteração. Os efeitos do laser estão relacionados à absorção do feixe pelo tecido, dependente da presença de cromóforos (estruturas biológicas e moléculas que absorvem a luz em um comprimento de onda específico), também denominados fotoceptores (GUTKNECK; FRANZEN, 2004; KARU, 2008; PARKER, 2007).

As propriedades do laser que influenciam na interação com o tecido, além do comprimento de onda são: o modo de irradiação (contínuo ou interrompido), a quantidade de energia dos pulsos, o período de ação do pulso e o modo de aplicação (com ou sem contato, focado ou não, em movimento ou parado) (GUTKNECK; FRANZEN, 2004; KARU, 2008; PARKER, 2007).

Em princípio a profundidade de penetração da luz no tecido será tanto menor quanto maior for a sua absorção. A interação nos tecidos pode ser dividida em três grupos: efeito fototérmico, efeito fotoquímico e processos não lineares (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). O efeito fototérmico consiste da absorção da luz pelo tecido e a transformação da mesma em energia térmica; se houver aumento de temperatura entre 37° e 47° C, haverá lesão reversível dos tecidos normais; entre 45° e 60°C, ocorrerá edema, fusão de tecidos e denaturação de enzimas (fotohipertermia). A fotocoagulação ocorre com o aquecimento do tecido entre 60° e 100°C, havendo coagulação das proteínas e necrose. Acima de 100°C, há evaporação da água, carbonização e até evaporação de pedaços de tecidos (JANDA et al., 2003; MCKENZIE, 1990).

Os lasers Nd:YAG e diodo em modo desfocado atuam principalmente como instrumentos de coagulação, levando à produção de grandes zonas de coagulação na profundidade do tecido (JANDA et al., 2003). A coagulação representa uma agressão

aos tecidos, desencadeando uma resposta inflamatória; pode atrasar a cicatrização e até aumentar o risco de infecção. Por outro lado, a contração dos tecidos moles e o calor que acompanha a coagulação pelo laser podem contribuir na selagem dos vasos (realizando uma espécie de laqueadura destes). Quanto maior a interação tecidual e o claro do laser (no limite da necrose tecidual), maior o tamanho dos vasos que podem ser selados, o que é uma medida da eficiência hemostática do laser (MCKENZIE, 1990).

Também é importante para a ação do laser, as propriedades óticas do tecido tratado. A distribuição da luz é diferente em tecidos normais e patológicos; por exemplo a penetração do laser é 2,5 vezes menor na pele normal do que na pele com úlcera (KOLAROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 2002).

Os efeitos térmicos podem se estender por áreas que o laser não atingiu devido à propagação do calor. Os processos não-lineares envolvem ablação fotomecânica, com evaporação explosiva do tecido, ablação a frio, com evaporação explosiva sem que haja tempo de transmitir o calor a tecidos adjacentes, e ablação térmica, em que a baixa densidade de potência leva à remoção lenta do tecido e à transmissão de calor aos tecidos adjacentes (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Os processos fotoquímicos consistem de baixa absorção de energia pelo tecido, ativando processos bioquímicos intracelulares (ainda pouco conhecidos) e realizando assim foto-ativação e biomodulação (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). O laser de diodo possui afinidade principalmente com cromóforos, hemoglobina e melanina, e com o citocromo c oxidase (KARU; KOLYAKOV, 2005; KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2004; KARU et al., 2005).

Dentre as várias hipóteses sobre o mecanismo de ação fotoquímica do laser, podemos citar o modelo de Karu no qual a luz visível (vermelho à infra-vermelho próximo) é absorvida pelas mitocôndrias e causa mudanças fotoquímicas nos fotoceptores das mitocôndrias, que aceleram a síntese de ATP, levando a repercussões nas outras partes da célula, incluindo o sistema de membranas. É nas membranas que atua o laser infravermelho (onde é absorvido); leva a alterações no funcionamento da bomba de sódio/potássio e altera a energia celular, provocando vibrações moleculares que se traduzem intracelularmente por um incremento de síntese de ATP (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; SMITH, 1991). Nessa interação ocorrem também alterações nas propriedades de oxirredução da célula, liberação de óxido nítrico e formação de oxigênio singleto (KARU; KOLYAKOV, 2005).

Essa oxidação foi associada à estimulação da vitalidade celular. Células lesadas possuem pH mais baixo que o normal, no qual o estado redox é alterado, sendo consideradas mais sensíveis à ação estimuladora da radiação laser (KARU; KOLYAKOV, 2005). Essas mudanças físicas ou químicas desencadeiam uma cascata bioquímica de reações que não precisam de posterior ativação de luz e que ocorrem no escuro (transdução), caracterizada pela proliferação ou diferenciação celular ou síntese protéica (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004; KARU; KOLYAKOV, 2005).

2.2.1 Laser de diodo e reparação tecidual

O laser de diodo semiconductor pode ser constituído de arseneto de gálio (GaAs) ou arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) no espectro infravermelho (GUTKNECHT;

FRANZEN, 2004). Esses lasers possuem um mecanismo de funcionamento um pouco diferente da maioria dos lasers; ele é constituído por um “sanduíche” de cristais de pólos positivos e negativos, sendo a radiação emitida pela lateral dessa pilha, que são faces polidas perpendicularmente à saída do feixe e servem como espelho do ressonador. A emissão do laser se dá pela passagem de uma corrente elétrica que estimula a emissão dos fótons (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). Seu espectro varia entre 630 e 908 nm, pode ser utilizado no modo contínuo ou pulsado, e seu feixe em geral é conduzido por fibra óptica (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). O laser de diodo tem penetração no tecido até 3 mm sem perda da potência (DAMANTE et al., 2008; KARU; KOLYAKOV, 2005). Comprimentos de onda longos são mais resistentes ao espalhamento e penetram profundamente nos tecidos; a luz do laser de GaAlAs penetra mais de 2 mm antes de perder 37% de sua intensidade, porém, dependendo da potência, a penetração pode atingir (com perda) até 1,5 cm, quando então alcança nervos, músculos e articulações (BASFORD, 1995).

Alguns trabalhos na literatura analisam o efeito do laser de diodo na reparação tecidual. Alta produção de colágeno e maior proliferação fibroblástica foram observados por Taylor et al. (1997) em incisões lineares feitas em pele de ratos utilizando laser de diodo (805nm, 10W contínuo) e laser de Nd:YAG (1064nm, 10W, contínuo). O laser de diodo exibiu maiores áreas de dano térmico comparativamente ao laser de Nd:YAG; ambos os lasers exibiram infiltrado inflamatório mais intenso comparativamente ao bisturi convencional. Ao final de 21 dias, remodelação colagênica e ausência de inflamação foram observados na mesma intensidade nos grupos tratados com laser e com bisturi convencional.

Janda et al. (2003) compararam o efeito térmico gerado pelos lasers diodo (modo contínuo, com 830 e 940 nm), Nd:YAG (1064nm) e Ho:YAG (3-20Hz, duração do pulso de 250ms, 2080nm), todos com contato sobre a superfície tecidual (tecido muscular de peru), gerando energia próxima de $800\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores verificaram carbonização severa na superfície tecidual com os lasers de diodo e Nd:YAG e pouca denaturação/coagulação protéica na profundidade dos tecidos, contrariamente ao laser de Ho:YAG, o qual provocou ablação e grandes áreas de coagulação tecidual.

Damante et al. (2004) analisaram histometricamente a mucosa gengival de pacientes submetidos a gengivoplastia e posteriormente a irradiação de laser de diodo em baixa intensidade (670 nm, $6\text{J}/\text{cm}^2$) comparativamente a mucosa gengival sem irradiação. Os autores não verificaram diferenças no processo de regeneração epitelial e da lâmina própria da mucosa gengival entre os espécimes.

D'Arcangelo et al. (2007), ao realizar incisões com bisturi convencional e laser de diodo no palato duro de ratos machos adultos, verificou maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos tecidos reparativos dos animais irradiados com laser em relação ao bisturi, bem como maior reação inflamatória e produção colagênica expressiva nesse grupo após 7 dias da incisão.

Eduardo et al. (2007) verificaram em cultura de células que a fototerapia com laser de diodo (GaAlAs 660nm e InGaAlP 780nm, com 40mW e 70mW respectivamente e 3 ou $5\text{J}/\text{cm}^2$) aumenta a taxa de crescimento de células epiteliais sob estresse de deficiência nutricional. Esse crescimento é diretamente proporcional ao

número de irradiações, porém estas não foram suficientes para aumentar o fator de crescimento de células em condições nutricionais normais.

Segundo Damante et al. (2008), o uso do laser de diodo infravermelho (e InGaAlP 780nm, com 40mW e 3 ou 5 J/cm²) não levou ao aumento da liberação de fator de crescimento de queratinócitos em grupos irradiados com laser comparativamente aos não-irradiados. Houve, contudo, maior liberação de fator de crescimento para fibroblastos nos grupos tratados com laser infravermelho, levando os autores a concluir que o aumento da produção de fator de crescimento para fibroblastos pode ser um dos mecanismos pelo qual o laser infravermelho estimula a cicatrização. Resultado semelhante foi também obtido por Pereira et al. (2002), que, utilizando um laser de diodo (As-Ga 904nm) verificaram ainda estímulo da proliferação dos fibroblastos sem prejuízo na síntese de procolágeno (com densidade de energia de 3 a 4 J/cm²).

Rezende et al. (2007) avaliaram o efeito do tratamento com laser de diodo (830nm, 60mW) através de uma única irradiação em cicatrizações de feridas cutâneas e observaram diferenças em vários aspectos do processo de cicatrização, como o menor grau de inflamação, maior formação e melhor organização do colágeno, maior neovascularização e maior epitelização. Verificaram também que a dose aplicada é importante, pois diferentes respostas teciduais foram detectadas de acordo com a variação das dosagens (obtiveram melhores resultados com a dose de 1,3J/cm² do que com 3J/cm²). Os autores sugerem que a redução na duração das fases da inflamação resulta no início mais rápido dos estágios proliferativos da cicatrização e que há um melhor arranjo das fibras colágenas nos tecidos irradiados.

O laser é utilizado para o reparo de diversos tipos de úlceras na boca, dentre elas as úlceras causadas por medicações quimioterápicas. Campos et al. (2009) realizaram tratamento com laser de diodo de alta potência desfocado (1W, 10J/cm²) em pacientes com úlceras causadas por medicações quimioterápicas e verificaram a diminuição da sintomatologia dolorosa e a maior cicatrização, utilizando o laser.

2.3 HSP e laser em estruturas da cavidade oral e em pele

Capon e Mordon (2003) discutem, em artigo de revisão, a produção de calor gerada pelos lasers quando aplicados sobre a pele durante ação terapêutica de remoção tecidual, remodelamento ou remoção de cicatrizes. Os autores comentam que o calor gerado pode ser superficial, mas intenso (quando se utiliza, por exemplo, o laser Er:YAG e o CO₂) ou então pode atingir regiões mais profundas, mas com menos intensidade (como é o caso de laser de luz visível). A temperatura de 45-50°C pode ser atingida nos tecidos vizinhos à aplicação laser, e esse aumento de temperatura é suficiente para gerar a produção de HSP. A produção de Hsp70, a qual é supra-expressa na pele quando submetida ao laser, está atrelada ao aumento da expressão de TGF- β , fator de crescimento responsável pela colagenização. Os autores concluem que é benéfica a aplicação do laser sobre a pele para favorecimento da reparação, considerando-se a resposta pró-reparativa das HSPs. O mesmo foi concluído por Souil et al. (2001) após a aplicação de laser de 810nm sobre o dorso de ratos, o que

provocou superexpressão da Hsp 70 por períodos prolongados, sendo essa expressão benéfica para o reparo tecidual.

Beckham et al. (2004) avaliou, por bioluminescência, a produção de Hsp70 em cultura de fibroblastos murinos submetidos à irradiação por laser Ho:YAG durante 10 segundos (30 pulsos). Houve um aumento da transcrição da Hsp70 quando as células estavam sob 65mJ/pulso, o que correspondeu à temperatura de 43°C, entre a 4^a e a 8^a hora de experimento. Os autores observaram também uma variação grande na liberação de Hsp70 segundo os pulsos emitidos, bem como um decréscimo desses níveis a partir da 12^a hora.

Hantash et al. (2007) testaram a ação de um novo laser de CO₂ (30W, 5 a 40 mJ) realizando uma pequena incisão sobre a pele humana de 24 indivíduos e, posteriormente, biópsia da região e testes imunoistoquímicos para as proteínas Hsp72 e Hsp47 em diferentes períodos experimentais. Os autores verificaram dano térmico nos cortes histológicos, que envolvia a epiderme e a derme. A expressão das proteínas Hsp72 e 47 não diferiu em relação aos controles não-tratados nos períodos de 24h; em 48h e 7 dias pós-tratamento com o laser, houve aumento da expressão da Hsp72 na epiderme e ao redor da zona de coagulação, mas ausência de expressão na zona necrótica; a Hsp47 não diferiu do controle no período de 48h, mas exibiu aumento em 7 dias na região da camada basal da epiderme, característica que permaneceu até o período experimental de 1 mês. No período de 3 meses, houve manutenção do grau de expressão da Hsp47 e uma maior difusão dessa proteína pela derme, bem como um declínio da Hsp72. Os autores concluem que a expressão da Hsp72 foi condizente com os dados da literatura e que a expressão tardia da Hsp47, marcador do metabolismo das proteínas colagênicas, é um indício de que a colagenização continua a longo prazo.

Brown et al. (2007) verificaram o efeito protetor de agentes resfriadores (placa fria com temperatura entre 5 e 25°C) durante a aplicação de laser Nd:YAG (2Hz, 30J/cm², 25ms) sobre a pele de 21 ratos. Os autores verificaram a expressão imunohistoquímica e a quantificação (por Western Blot e Elisa) das proteínas Hsp47 e Hsp70 em 10 e 24h, e 4, 14 e 28 dias pós-tratamento com laser. Houve aumento da expressão da Hsp47 em relação ao controle nos períodos de 14 e 28 dias nos espécimes sem resfriamento, e uma diminuição significativa dessa expressão nas situações em que o resfriamento atingiu 5° C. Já a Hsp70 foi identificada nos períodos iniciais do experimento, e um aumento da sua expressão foi observado nos períodos de 12 a 24h. Houve declínio dessa expressão nos demais períodos experimentais. Quando houve resfriamento, a expressão da Hsp70 foi menor, principalmente quando a temperatura estava abaixo de 10°C. Os autores concluem que o resfriamento até 13°C no local da aplicação do laser é eficiente para diminuir ou anular o efeito térmico sobre o tecido.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Verificar a influência da irradiação laser e do conseqüente aumento de temperatura local sobre a expressão imunoistoquímica das proteínas Hsp27 e Hsp47 em úlceras linguais.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar anátomo-cronologicamente a expressão imunoistoquímica das proteínas Hsp27 e Hsp47 nos tecidos ulcerados.
- Analisar as variações de temperatura geradas pela aplicação do laser, através da utilização de câmera termográfica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia a seguir descrita foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, subcomissão de Bioética em Animais, da Faculdade de Odontologia da USP (Anexo A).

4.1 Grupos experimentais

56 animais (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), adultos, fêmeas, com cerca de 200g, foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- a) grupo ulcerado não tratado (GN) – 15 animais, com indução de úlcera no ventre lingual, mantidos sem tratamento até o final do experimento.
- b) grupo ulcerado tratado com laser (GL) – 15 animais, com indução de úlcera no ventre lingual e posterior aplicação de laser de diodo de 810nm sobre a superfície ulcerada.
- c) Grupo controle (negativo) sem úlcera e sem tratamento com laser (CN) – 3 animais, sem úlcera e sem tratamento com laser.
- d) Grupo controle (positivo) sem úlcera e com tratamento com laser (CP) – 3 animais, sem úlcera e com tratamento com laser de diodo de 810nm sobre o ventre lingual.

Os animais sofreram eutanásia nos tempos experimentais de zero hora, 24h, 48h, 72h e 120h dias pós-aplicação do laser (3 animais para cada período). Foram mantidos durante o experimento no Laboratório Experimental da Disciplina de Cirurgia e

Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP, com ciclo claro-escuro e sob exaustão de ar e temperatura controlada (21°C). A eutanásia foi feita com overdose de anestésico (quetamina e xilazina).

4.2 Indução de úlceras no ventre lingual

Em todos os animais foram induzidas úlceras no ventre da língua seguindo-se protocolo adaptado de Fujisawa, Miyamoto e Nagayama (2003). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (Dopalen®, Vetbrands) associada a xilazina (Anasedan®, Vetbrands), na proporção 0,1 ml/kg de quetamina e 0,01ml/kg de xilazina. Em seguida, a língua foi tracionada para fora da cavidade bucal e, sobre o ventre lingual, foi aplicado, durante 60 segundos, um filtro de papel de 5mm X 5mm contendo 20µl de ácido acético a 50% (Figura 4.1). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração comercial (Purina®) e água *ad libitum*. Após o contato com o ácido acético (24h), formou-se uma bolha na região, a qual posteriormente se rompeu gerando a ulceração. Assim, o tempo zero do experimento foi após 24h do contato com o ácido acético.

Figura 4.1 – Indução da úlcera

4.3 Aplicação do laser de diodo

Os animais do grupo GL receberam tratamento com laser de diodo (ZAP Lasers®, Pleasant Hill, CA, USA, 810 nm), aplicado a 0,4mm de distância da lesão (modo desfocado) com os seguintes parâmetros: 0,5 W de potência, pulsado (frequência de pulso de 10 Hz), por 40 segundos (método varredura) (SIMÕES et al., 2007). A potência foi aferida através do equipamento Power Meter (Coherent Molelectron®, Santa Clara, CA, USA) a cada utilização. Calcula-se que a densidade de energia no spot foi de $41,6\text{J}/\text{cm}^2$; a energia total despendida no tecido, (considerando a área de úlcera, padronizada em $0,25\text{cm}^2$) foi de $80\text{J}/\text{cm}^2$. O procedimento de aplicação (Figura 4.2) do laser foi feito por um único operador, juntamente com um auxiliar, ambos utilizando óculos de proteção, específico para o comprimento de onda do laser de diodo

e demais equipamentos de proteção individuais (EPIs). O equipamento de laser ZAP e o Power Meter foram fornecidos, sob empréstimo, pelo Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) da Faculdade de Odontologia da USP.

Figura 4.2 – Ulcera formada após 24h da indução(a) e aplicação do laser de diodo (b)

4.4 Coleta e acondicionamento dos tecidos para análise

No momento da eutanásia, a língua foi retirada e acondicionada em frasco contendo formol 10%, no qual permaneceu por 24h, sendo posteriormente direcionada para processamento histológico de rotina e emblocamento em parafina. Esse material foi destinado à obtenção de cortes histológicos em hematoxilina-eosina (HE) e à técnica de imunistoquímica para evidenciação das proteínas Hsp27 e Hsp47.

4.5 Análise dos cortes histológicos corados em HE

Os cortes histológicos corados em HE foram observados em microscopia de luz convencional por dois examinadores previamente calibrados para análise semiquantitativa dos elementos teciduais presentes de acordo com Walker 2006. Essa análise compreendeu a gradação em ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3) dos seguintes elementos: edema, infiltrado inflamatório, necrose, tecido de granulação, epitelização e colagenização.

4.6 Técnica de imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas, foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase e foram usados anticorpos mono e policlonais contra Hsp27 e Hsp47 (AbCam, Cambrige, UK). Cortes de 3 μm de espessura foram obtidos dos fragmentos de língua emblocados em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma Chemical CO, St Louis, MO/USA). Esses cortes foram desparafinados e reidratados em série decrescente de etanóis. Foi realizada a recuperação antigênica para o anticorpo anti-Hsp27 com ácido cítrico pH 6,0, durante 20 minutos em forno de microondas. Esse procedimento não foi necessário para o anticorpo anti-Hsp47. As lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Foi realizada incubação do anticorpo primário (diluição de 4 $\mu\text{g/ml}$ na

Hsp27 e 1:1000ml na Hsp47), seguida pela incubação do anticorpo secundário e do complexo terciário (estreptavidina, biotina e enzima peroxidase). Para a incubação do anticorpo secundário e do complexo terciário foi utilizado o kit LSAB Peroxidase K0609 (Dako Corp. CA, USA). A reação então foi revelada pela diaminobenzidina 0,025% (Sigma Chemical CO, St Louis MO/USA), os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanóis, diafanizados em xilol e montados em resina para microscopia de luz convencional. Para o controle negativo das reações os cortes foram incubados em tampão sem anticorpo. Como o controle positivo recomendado pelo fabricante envolvia células de cultura, este foi estabelecido pelo corte da língua sem lesão e sem irradiação laser, observando-se o padrão de marcação para fibroblastos (no caso da Hsp47) e para músculo estriado esquelético (no caso da Hsp27) e comparando-se com os dados na literatura.

Esses testes foram realizados no Laboratório de imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP e no Laboratório de Patologia Experimental da Disciplina de Patologia Geral da FOUSP.

Para análise qualitativa das lâminas e posterior descrição, foram considerados os seguintes aspectos:

- Localização da marcação: epitélio preexistente, epitélio neoformado, fibroblastos, células da parede vascular, células inflamatórias, matriz extracelular, fibra muscular esquelética.
- Intensidade da marcação: de acordo com a gradação estipulada em (WALKER 2006), a qual corresponde a 0 = nula; 1 = discreta; 2 = discreta a moderada; 3 = moderada a intensa; 4 = intensa.

4.7 Análise histomorfométrica quantitativa

Os cortes histológicos dos testes imunoistoquímicos foram submetidos à análise morfométrica de quantificação das células positivas para Hsp47. Para tal, 24 campos histológicos de cada espécime foram digitalizados por intermédio de microscópio de luz convencional (Laborval, Zeiss, Alemanha) contendo câmera CCD (Sony, Japão) conectada a software de captura de imagens (Captivator). As regiões digitalizadas (8 campos para cada) corresponderam a: zona superficial ulcerada (região A) - cerca de 0,5 mm da superfície da úlcera, imediatamente abaixo da camada necrótica ou de crosta; zona intermediária (região B) – cerca de 1,5 a 1,7 mm distante da superfície, na região da submucosa; zona profunda (região C) – distante cerca de 2,7 a 3 mm da superfície, imediatamente abaixo do epitélio do dorso lingual em sentido oposto à ulceração. Essas regiões, marcadas na figura 4.3, corresponderam à análise termográfica efetuada posteriormente (ver item 4.8).

Foi utilizado aumento de 400X e intensidade de luz padronizada, com seleção manual das células positivas e posterior quantificação automatizada pelo *software* de morfometria ImageLab 2000 (ImageLab, Brasil). Foram consideradas células positivas as coradas em castanho, independentemente da intensidade. Foram quantificadas somente as células com morfologia fibroblástica, evitando-se as demais células (endoteliócitos em sua maioria), pelo fato de exibirem marcação por vezes dúbia.

Figura 4.3 – Áreas de análise histomorfométrica quantitativa (aumento 40x)

4.8 Técnica de Termografia no Infravermelho

Para a aferição da variação de temperatura gerada pelo laser, o experimento foi reproduzido *in vitro*, com os mesmos parâmetros e modo de aplicação realizados *in vivo*. O experimento foi realizado no Laboratório de Biofotônica do Centro de Laser e Aplicações - CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Foram selecionadas 05 línguas de ratos previamente ulceradas. Estas foram irradiadas com o laser de diodo calibrado com os mesmos parâmetros do experimento *in vivo* (ZAP Lasers®, Pleasant Hill, CA, USA). Foi medida a potência antes de cada experimento com o equipamento Power Meter (Coherent Molelectron®, Santa Clara, CA, USA).

As variações de temperatura na profundidade da língua foram registradas utilizando-se uma câmera termográfica (ThermaCam FLIR S C3000 Systems, EUA), com precisão de 0,01 °C e tempo de resposta de 0,02 s. Para a captura das imagens foi utilizada uma câmera cuja lente possui distância focal de 0,1 m. A câmera foi ajustada para uma frequência de captura de 60Hz e para registrar temperaturas no intervalo - 5°C e +98°C. Durante o experimento o ambiente foi mantido em condições de temperatura constante a 21,5° C, com umidade relativa de aproximadamente 50%. A emissividade térmica² da língua foi considerada 0,99 (BRIOSCHI et al., 2002).

As línguas foram posicionadas a 10 cm da câmera, de forma que uma imagem nítida e definida da lateral da língua (Figura 4.4) fosse visualizada no software da própria câmera (ThermaCam®, ThermaCam Research 2001, Boston, MA, EUA). Foram selecionados pontos para análise da temperatura perpendicularmente à região irradiada, sendo o primeiro ponto de medida na superfície na língua, e os demais a aproximadamente 0,5 mm mais profundos que o ponto anterior, conforme ilustrado na figura 4.4.

A temperatura foi registrada 30s antes da irradiação, durante todo o período desta (40s) e 30s depois do término da mesma. Os dados de temperatura obtidos foram tabulados utilizando-se o software Microsoft Excel®.

² Conceito físico da quantidade de radiação infravermelha emitida por um corpo em função da natureza do corpo, da área exposta e da temperatura absoluta a que o corpo se encontra. É um número que varia da emissividade nula 0 à emissividade máxima 1.

Figura 4.4 - Visão lateral da língua em corte longitudinal com os pontos de análise de temperatura. As variações de cor indicam as oscilações de temperatura de acordo com a escala ao lado. Nessa imagem, a irradiação laser já havia ocorrido. (Ápice lingual, seta fina; base lingual, seta larga)

4.9 Testes Estatísticos

Para a análise dos dados obtidos por análise quantitativa da expressão da Hsp47, foram realizados testes estatísticos utilizando programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 13.0, para a obtenção dos resultados. Foram aplicados os seguintes testes: Teste de Mann-Whitney, e Teste de Kruskal-Wallis (Anexo B). O nível de significância (p) foi menor que de 5%. (0,050). Para a análise das variações de temperatura, foram calculados média e erro-padrão de cada conjunto de dados.

5 RESULTADOS

5.1 Variações de temperatura observados no teste in vitro

Foi possível verificar a variação de temperatura nos pontos seleccionados durante todo o período de gravação. Para isso, foi construído gráfico da temperatura em diferentes profundidades para cada língua em função do tempo, conforme exemplificado no gráfico 5.1. A temperatura inicial das amostras foi de aproximadamente 22 °C.

Gráfico 5.1 – Temperatura para diferentes profundidades em função do tempo. Curva de variação para um espécime a título de exemplo

Observa-se que no momento da irradiação (por volta de 30 s), há aumento abrupto de temperatura na superfície e até 1 mm de profundidade; há aumento também nas demais profundidades, porém este é mais suave em relação às regiões mais superficiais. O declínio da temperatura ocorre por volta de 70s, ou seja, imediatamente após o término da irradiação. A região superficial demonstra uma queda abrupta de temperatura (devido a perda mais rápida de calor) ao ser comparada com as demais regiões, cujo declínio é mais suave até o tempo de 100s. Todos os espécimes exibiram curvas semelhantes a essa do gráfico 5.1.

Na tabela 5.1 são apresentadas as variações de temperatura média em diferentes profundidades, juntamente com a incerteza (erro-padrão) da medida durante a irradiação laser. Observa-se uma variação decrescente da superfície para as regiões mais profundas, com a máxima variação média de 6,7 °C.

Tabela 5.1: Médias da variação de temperatura (°C) e incertezas (erro-padrão) obtidas em diferentes profundidades da língua durante a irradiação com o laser de diodo

Local	Variação de temperatura °C
Superfície	6,7 _C 0,5
0,5 mm	5,2 ± 0,6
1,0 mm	4,3 ± 0,5
1,5 mm	3,2 ± 0,3
2,0 mm	2,85 ± 0,10
2,5 mm	2,77 ± 0,23

5.2 Análise semiquantitativa das lâminas em coloração de hematoxilina-eosina

A tabela 5.2 contém a análise de elementos teciduais diretamente envolvidos no processo de reparo, de acordo com o período e o grupo experimental.

Tabela 5.2 – Gradação dos elementos teciduais indicativos do processo reparativo nas úlceras linguais em função dos grupos e tempos experimentais

Tempos e grupos experimentais	0h		24h		48h		72h		120h	
	GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL
Dano térmico	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
Hiperemia	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
Infiltrado inflamatório	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
Necrose	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
Fibroblastos jovens	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3
Neovascularização	0	0	1	2	2	3	2	3	3	3
Reepitelização	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3
Colagenização	0	0	0	0	1	1	2	3	3	3

GN – grupo com úlcera sem laser; GL – grupo com úlcera e com laser; 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = intenso.

Observa-se que ambos os grupos tiveram intensidade semelhantes na maioria dos elementos observados. Houve discreto dano térmico em GL0 e a diminuição do edema ocorreu primeiramente em GL (t=72h). O GL teve uma queda do infiltrado inflamatório em 48h, seguindo uma queda gradativa em 72h e 120h, terminando com expressão discreta (como GN). Quanto aos fibroblastos jovens, o grupo GL mostrou maior quantidade em 24h, 48h e 72h, igualando-se novamente a GN somente em 120h. Para a neovascularização, observou-se maior intensidade em GL a partir de 24h, igualando-se a GN em 120h. Já a reepitelização iniciou primeiramente em GL (t=24h). Em relação à colagenização, GL tem um grande aumento entre os períodos 48h e 72h, enquanto GN teve um aumento gradativo.

Em 72h, 2 animais no GL e 1 animal do GN exibiam reepitelização completa em termos histológicos. Em 120h, todos os animais de ambos os grupos estavam clinicamente sem presença de ulceração; 1 animal de cada grupo ainda exibiu discreta ulceração em termos histológicos.

5.3 Análise semiquantitativa da expressão imunoistoquímica da Hsp27

A tabela 5.3 contém a intensidade da expressão imunoistoquímica da Hsp27 em estruturas teciduais importantes para a análise do processo de reparo, de acordo com o período e o grupo experimental. Essa análise diz respeito à região próxima a úlcera, ou seja, à região A.

Tabela 5.3 – Gradação da expressão imunoistoquímica da Hsp27 em elementos teciduais localizados na região próxima à úlcera (região A)

Tempos e grupos experimentais	CN	CP	0h		24h		48h		72h		120h	
			GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL
Camada granulosa do epitélio preexistente	3	3	1	4	1	2	2	4	2	4	3	4
Camada espinhosa do epitélio preexistente	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1
Camada basal do epitélio preexistente	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Camada granulosa do epitélio em migração	X	X	X	2	1	2	2	3	3	3	3	3
Camada espinhosa do epitélio em migração	X	X	X	2	1	1	1	3	2	3	1	1
Camada basal do epitélio em migração	X	X	X	2	0	2	2	3	2	3	0	0
Fibroblastos	1	1	0	2	0	2	1	2	1	2	0	0
Células da parede vascular	1	1	1	3	1	3	2	3	2	3	1	1
Células inflamatórias	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Matriz extracelular	0	0	2	2	1	1	2	2	1	1	0	0
Fibra muscular esquelética	3	3	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3

X = inexistência da estrutura no período experimental; 0 = marcação negativa; 1 = marcação fraca; 2 = marcação de fraca a moderada; 3 = marcação de moderada a intensa; 4 = marcação intensa.

Analisando a tabela 5.3, comparando os grupos controle, vemos que não houve diferenças de expressão entre esses grupos, mostrando que o laser, sem a presença de úlcera não alterou a expressão de Hsp27.

Analisando o epitélio pré-existente, na camada granulosa do epitélio pré-existente, GL apresentou uma expressão maior que GN e um pouco maior que os

grupos controle, GN aumentou gradativamente a expressão, porém não chegou a apresentar expressão tão intensa quanto GL. Na camada espinhosa do epitélio preexistente, houve uma expressão homogênea entre os grupos e os tempos experimentais.

Analisando o epitélio em migração, a camada granulosa era inexistente em 0h para o grupo GN, enquanto o grupo GL já apresentava marcação fraca a moderada, aumentando no período de 72h para moderada (grau máximo de intensidade que atingiu); na mesma camada GN teve sua expressão aumentada gradativamente, atingindo o mesmo nível de marcação que GL em 72h. Na camada espinhosa assim como na granulosa era inexistente em 0h para o grupo GN, enquanto o grupo GL já apresentava marcação fraca a moderada. A expressão foi variando nos dois grupos durante os tempos experimentais, terminando ambas com fraca marcação (menos intensa que no epitélio preexistente dos grupos controle). A camada basal mostra a mesma tendência das outras camadas do epitélio em migração.

A marcação dos fibroblastos foi fraca a moderada nos períodos de 0h a 72h em GL e nula ou fraca nos mesmos períodos em GN, terminando ambos os grupos nulos em 120h, diferentemente dos grupos controle.

Nas células da parede vascular a marcação foi moderada em GL dos períodos de 0h a 72h e em GN foi fraca nos períodos 0h e 24h e fraca a moderada nos períodos 48 a 72h, não atingindo a intensidade moderada como em GL.. Os grupos apresentavam marcação fraca no tempo 120h.

A figura 5.1 reúne imagens desses padrões de marcação imunoistoquímica para a Hsp27 nos períodos de 0h a 72h. O período de 120h encontra-se na figura 5.3.

Figura 5.1 – **A:** Intensa marcação positiva principalmente nas camadas superficiais do tecido epitelial adjacente à borda da úlcera. Observa-se também marcação discreta na parede vascular e intensa nas fibras musculares esqueléticas. Já é possível observar intenso infiltrado inflamatório na região ulcerada e próximo à área necrótica superficial. **B:** Maior aumento na lâmina própria em que se nota o padrão de marcação intenso na parede vascular e nos fibroblastos; (EB, 200X). **C:** Moderada marcação no tecido necrótico superficial da úlcera, em algumas células da camada basal do epitélio em migração e nas camadas superficiais do epitélio preexistente. **D:** Marcação moderada nos queratinócitos em todas as camadas epiteliais, nos fibroblastos e na parede vascular. **E e F:** Padrão diferente de marcação epitelial, com maior área de marcação no epitélio em migração em F. Nesta, área de edema com positividade também se faz presente. **G e H:** Positividade moderada (G) e intensa (H) no epitélio em migração, nas fibras musculares e na parede vascular (EB, 40X em todas as imagens exceto B)

5.4 Análise semiquantitativa da expressão imunoistoquímica da Hsp47

A tabela 5.4 contém a intensidade da expressão imunoistoquímica da Hsp47 nas mesmas estruturas analisadas para a Hsp27, de acordo com o período e o grupo experimental. Essa análise também diz respeito à região próxima a úlcera, ou seja, à região A.

Tabela 5.4 – Gradação da expressão imunoistoquímica da Hsp47 em elementos teciduais localizados na região próxima à úlcera (região A) (continua...)

Tempos e grupos	CN	CP	0h	24h	48h	72h	120h
-----------------	----	----	----	-----	-----	-----	------

experimentais			GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL
Camada granulosa do epitélio preexistente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Camada espinhosa do epitélio preexistente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Camada basal do epitélio preexistente	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0
Camada granulosa do epitélio em migração	X	X	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
(conclusão)												
Tempos e grupos experimentais	CN	CP	0h		24h		48h		72h		120h	
			GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL	GN	GL
Camada espinhosa do epitélio em migração	X	X	0	1	3	1	1	1	1	1	0	0
Camada basal do epitélio em migração	X	X	1	2	3	2	3	3	3	3	1	0
Fibroblastos	1	3	2	3	3	3	4	4	3	4	3	3
Células da parede vascular	0	2	2	1	2	2	3	3	3	4	1	1
Células inflamatórias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matriz extracelular	0	0	2	1	2	1	2	2	1	2	0	0
Fibra muscular esquelética	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C = grupo sem úlcera e sem laser; CL = grupo sem úlcera e com laser; X = inexistência da estrutura no período experimental; 0 = marcação negativa; 1 = marcação fraca; 2 = marcação de fraca a moderada; 3 = marcação de moderada a intensa; 4 = marcação intensa.

Analisando a tabela 5.4, verifica-se que a expressão é nula no epitélio já existente, nas suas diversas camadas, com exceção para uma marcação na camada basal fraca a moderada em GL. Em alguns espécimes na qual foi observada reepitelização completa, a marcação era negativa nessa região em 72h. No epitélio em migração na camada granulosa houve expressão fraca em GN nos período 24h e em GL no período 72h; na camada espinhosa GL começou a expressar fracamente primeiro que GN (t=0h), porém no período seguinte (t=24h), GN apresentava expressão

moderada enquanto GL ainda apresentava expressão fraca, a expressão terminou nula em ambos os grupos no período 120h. Na camada basal do epitélio em migração houve o mesmo padrão de expressão da camada espinhosa, porém, com intensidades de marcação maiores, atingindo um grau moderado, finalizando com expressão fraca para o grupo GN e nula para o grupo GL.

Os fibroblastos mostram-se em um primeiro momento ($t=0h$) marcados com intensidade de fraca a moderada em GN e moderada em GL. No período de 24 horas GN e GL apresentam um grande número de fibroblastos com marcação moderada, atingindo um grau intenso em 48h; nos períodos mais tardios em ambos os grupos nota-se expressão moderada. A expressão da Hsp47 nos fibroblastos é o primeiro momento que os grupos CN e CP mostram diferenças; o grupo CP mostra uma marcação moderada enquanto o CN apresenta uma marcação fraca. Os grupos ulcerados igualam-se à CP no período final do experimento, não voltando à expressão de CN quando não há nenhuma alteração ou interação com o tecido.

Quanto às células da parede vascular, GN apresentou marcação inicial de fraca a moderada, aumentando o grau de marcação até moderado em 72h e diminuindo para fraco em 120h. GL apresentou marcação inicial fraca, aumentando gradativamente até a marcação intensa em 72h, porém, assim como GN, apresentou marcação fraca em 120h. Para essa estrutura tecidual também houve diferença entre CN e CP e entre esses dois grupos e os grupos ulcerados.

Analisando a matriz extracelular GN apresentou nos períodos iniciais maior marcação que GL, porém houve inversão do grau de marcação em 72h e ambos os grupos terminaram com marcação nula, assim como CN e CP.

A figura 5.2 reúne imagens ilustrativas desses padrões de marcação imunoistoquímica para a Hsp47 nos tempos de 0h a 72h. O tempo experimental de 120h encontra-se na figura 5.3.

	HSP 47 GN	HSP 47 GL
0h	A	B
24h	C	D
48h	E	F

Figura 5.2 – **A:** Positividade de discreta a moderada na matriz extracelular e no líquido de edema, no tecido necrótico superficial e nos fibroblastos da lâmina própria. **B:** Positividade somente nos fibroblastos da lâmina própria e negatividade no tecido necrótico superficial. **C e D:** Em ambos, nota-se positividade intensa nos queratinócitos basais das bordas da úlcera, no tecido necrótico superficial e nos fibroblastos da lâmina própria. Em D, o infiltrado inflamatório é bastante reduzido em relação a C. **E e F:** Ambos exibem intensa marcação positiva nos fibroblastos da lâmina própria, os quais são numerosos e dispersos na base da úlcera. Nota-se marcação intensa em todos os queratinócitos do epitélio em migração em F, e somente nos queratinócitos da camada basal em E. **G:** Reepitelização completa com marcação moderada na região do epitélio recém-migrado e positividade intensa nos fibroblastos do tecido de granulação. **H:** Reepitelização completa, sem marcação positiva; positividade intensa nos fibroblastos do tecido de granulação e discreta na matriz extracelular recém-depositada, a qual ainda não adquiriu aspecto fibrilar. (EB, 40X em todas as imagens)

120h

Figura 5.3 – **A e B:** Padrão de marcação nos espécimes em que não houve reepitelização completa nos cortes histológicos, no qual se nota positividade intensa nas camadas superficiais epiteliais. O tecido necrótico superficial de A também exibe positividade intensa em pequena extensão. **C:** Padrão de marcação positiva intensa nos fibroblastos do tecido de granulação, os quais são numerosos e adjacentes à base da úlcera, a qual já sofreu reepitelização completa. Nota-se positividade em alguns queratinócitos da camada basal. **D:** Menor quantidade de fibroblastos positivos e epitélio mais espesso, o qual exibe marcação negativa (EB, 40X em todas as imagens)

5.5 Análise morfométrica dos fibroblastos positivos para Hsp47

O gráfico 5.2 contém a média do número de células positivas para Hsp47 nos grupos controles sem lesão/com laser (CN) e sem lesão/sem laser (CP). Essa análise diz respeito à região próxima a úlcera (região A), região média da língua (região B) e a região abaixo do epitélio do dorso da língua (região C)

Gráfico 5.2 – Média do número de células positivas para Hsp47 nos grupos controles sem lesão/com laser e sem lesão/sem laser * = $p < 0,05$

O grupo sem lesão/com laser apresentou maior quantidade de células positivas para Hsp47 que o grupo sem lesão/sem laser nas regiões A e B, não havendo diferenças discrepantes na área C entre os grupos. Em termos gerais, observa-se menor número de células positivas para Hsp47 em relação aos grupos ulcerados, apresentados a seguir. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na área A ($p = 0,049$) e B ($p = 0,049$) entre os grupos controle.

O gráfico 5.3 contém a média do número de células positivas para Hsp47 em GN e GL. Essa análise diz respeito à região próxima a úlcera (região A).

Gráfico 5.3 – Média do número de células positivas para Hsp47 na região A. * = $p < 0,05$

O grupo GL (com lesão/com laser) exibiu maior quantidade de células positivas para Hsp47 em relação ao GN (com lesão/sem laser) nos períodos de 0h e 24h, igualando-se a quantidade de fibroblastos positivos em 48h. Em 72h, a quantidade de células positivas foi ligeiramente maior do que o GN. Em 120h nota-se uma queda abrupta de positividade no GL e um aumento substancial de células positivas em 120h. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos tempos 0h ($p = 0,049$) e 120h ($p = 0,049$) na região A.

O gráfico 5.4 contém a média do número de células positivas para Hsp47 em GN e GL. Essa análise diz respeito à região média da língua (região B).

Gráfico 5.4 – Média do número de células positivas para Hsp47 na região B. * = $p < 0,05$

O GL exibiu maior quantidade de células positivas para Hsp47 em relação ao GN em todos os períodos experimentais, com exceção de 120h, quando os valores se igualaram. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h na região B ($p = 0,049$) (indicada por um asterisco no gráfico)

O gráfico 5.5 contém a média do número de células positivas para Hsp47 em GN e GL. Essa análise diz respeito à região abaixo do epitélio do dorso da língua (região C), figura 5.4.

O GL exibiu maior quantidade de células positivas para Hsp47 em todos os períodos experimentais, com exceção do de 120h. Nesse período, o GN teve valores ligeiramente maiores. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em todos os tempos experimentais na região C ($p = 0,049$ nos tempos 0h, 24h, 48h e 120h e 0,046 no tempo 72h).

Gráfico 5.5 – Média do número de células positivas para Hsp47 na Região C. * = $p < 0,05$

HSP 47 GN – ÁREA C

HSP 47 GL – ÁREA C

24h

(A)

(B)

Figura 5.4 – **A e B:** Exemplo de padrão de marcação positiva na área mais distante da úlcera. Notam-se fibroblastos positivos em maior quantidade em B, localizados na região papilar da lâmina própria, próximos ao epitélio especializado do dorso da língua. Discreta (A) e moderada (B) positividade também é vista na camada de queratina do epitélio (EB, 40X)

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de verificar a influência da irradiação laser e do conseqüente aumento de temperatura sob o estresse celular, as proteínas de choque térmico foram escolhidas. Analisou-se a Hsp27 no intuito de inferir sobre a capacidade de proliferação e migração celular, já que o laser é um estimulante de proliferação (KARU; KOLYAKOV, 2005; REZENDE et al., 2007); já a Hsp47 foi selecionada para se verificar a ação sobre fibroblastos e, conseqüentemente, na produção colagênica, uma vez que é sabido que o laser estimula a produção de colágeno (TAYLOR et al., 1997). Através da análise da expressão das HSPs confirmou-se também que o laser é um agente estressante celular, já que desencadeou a expressão de HSPs (proteínas indicadoras de estresse celular) mesmo sem a presença de úlcera.

O aumento ou a diminuição da temperatura são fatores desencadeantes da expressão de proteínas de choque térmico. Aumentos discretos ou moderados de temperatura (entre 37 e 47°C) podem causar lesões reversíveis nas células (JANDA et al., 2003; MCKENZIE, 1990). Pelo experimento com a câmera termográfica, os parâmetros da irradiação laser utilizados (potência 0,5W, densidade de energia no spot de 41,6J/cm²) induziram no máximo a um aumento de $6,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o que, adicionado à temperatura corporal do animal, daria aproximadamente entre 42 e 43°C de temperatura máxima atingida na superfície da lesão. O calor foi transmitido desde a superfície ventral até a superfície dorsal da língua do rato, nesta porém em menor escala ($2,77 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$). Por não ter sido observada grande evidência de coagulação

protéica nos cortes histológicos, podemos inferir que não houve dano térmico que ultrapasse os limites celulares a ponto de causar necrose.

Pela análise semiquantitativa dos testes imunoistoquímicos e pela análise quantitativa da Hsp47, foi possível observar diferenças na intensidade de expressão das HSPs estudadas. Essa diferença pode ter ocorrido tanto pelo aumento de temperatura como pela ação fotoquímica do laser. A curva do aumento e decaimento da temperatura (Gráfico 5.1) demonstra que a região superficial ganha e perde calor mais rapidamente em função do início e término da irradiação. Esse gráfico ainda evidencia que as regiões mais profundas atingem um pico de aumento da temperatura ao final da irradiação, demorando mais tempo para o decaimento, o qual a 100 s ainda não se igualou ao início do experimento. Essa tendência parece se assemelhar à queimadura solar, havendo acúmulo de energia na profundidade do tecido (TRAUTINGER et al., 1997). Não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para que uma agressão térmica desencadeie a expressão das HSPs, portanto este fator não pode ser descartado como um dos causadores das diferenças de expressão dessas proteínas, apesar do curto espaço de tempo em que houve aumento de temperatura.

Já a ação fotoquímica do laser pode ter tido participação nas modificações de expressão imunoistoquímica tomando por base a premissa de que a irradiação laser altera o funcionamento da cadeia respiratória celular, gerando maior quantidade de radicais livres intracelulares; a presença destes em níveis aumentados comprovadamente está relacionada com o aumento da expressão de HSPs (ARRIGO et al., 2005). Assim, podemos dizer que as diferenças encontradas entre GN e GL são

devidas tanto à ação térmica quanto à ação fotoquímica do laser. Mais estudos são necessários comparando-se diferentes parâmetros e intensidade do laser para se estabelecer a real participação de cada um desses fatores na expressão das HSPs.

Pela análise semiquantitativa realizada nos cortes histológicos corados em HE, foram poucas as diferenças encontradas entre os grupos GN e GL, as quais se concentraram mais nos períodos de 72h e 120h, quando o grupo com laser exibiu maior quantidade de tecido de granulação e maior colagenização. Esse resultado pode estar relacionado à irradiação única da lesão, sendo semelhante a vários relatos na literatura tanto em pele quanto em mucosa oral (SOUIL et al., 2001). Uma única irradiação de laser nas condições experimentais descritas também não gerou danos que pudessem retardar o processo, nem aumentar a área de necrose por dano térmico. De uma maneira geral, nota-se que em GL houve redução do infiltrado inflamatório em períodos experimentais anteriores aos do GN, bem como reepitelização ligeiramente mais precoce, fatos que constituem aspectos positivos para o reparo.

A região de maior aumento de temperatura foi a superficial (área A), composta principalmente pelo tecido epitelial das bordas da úlcera e pela superfície da lâmina própria exposta. Essa região foi analisada semiquantitativamente para ambas as proteínas, sendo a seguir discutidas.

Pela tabela 5.3, a agressão induzida para a formação da úlcera foi suficiente, em 0h, para modificar o padrão de marcação da Hsp27 nos elementos teciduais analisados comparando-se aos grupos sem úlcera. As células inflamatórias, principalmente as de morfologia plasmocitária, exibiram padrão de marcação discreto nesse e nos demais

períodos experimentais até 72h. Esse resultado confirma a influência da ação química e da reação inflamatória sobre a expressão da Hsp27. A liberação de citocinas pró-inflamatórias está relacionada ao aumento da expressão das HSPs como um todo (MIYAMOTO et al., 2008), o que pode explicar parcialmente esse achado. Portanto, a úlcera por si foi suficiente para desencadear modificações no padrão normal da Hsp27, intensificando-se principalmente nas células da parede vascular e nos queratinócitos em migração. Como a Hsp27 está relacionada à manutenção da organização dos filamentos de actina intracelular para que ocorra uma correta migração celular (HIRANO; SHELDEN; GILMONT, 2004; LAPLANTE et al., 1998; PIOTROWICZ; HICKEY; LEVIN, 1998), essas células provavelmente estão expressando com mais intensidade essa proteína por estarem se deslocando e proliferando no tecido à medida que o reparo ocorre. Nesse sentido, provavelmente também na mucosa bucal ulcerada a Hsp27 tenha efeito protetor tal qual foi observado na mucosa estomacal (EBERT et al., 2005; TSUKIMI; OKABE, 2001). Em 120h, quando houve completa reepitelização e organização da lâmina própria, a expressão da Hsp27 nesse grupo praticamente se iguala ao controle sem úlcera. Este exibe padrão de marcação para Hsp27 bastante semelhante ao encontrado na literatura, quando somente as camadas epiteliais suprabasais e alguns fibrócitos e endoteliócitos exibem marcação (MONASTIRLI et al., 2005).

Ainda pela tabela 5.3, nota-se que o laser provocou expressão mais intensa da Hsp27 no tecido epitelial, nas células da parede vascular e em fibroblastos em praticamente todos os períodos experimentais. Esse padrão diferiu bastante do grupo sem úlcera e com laser (CL), o qual foi igual ao grupo sem úlcera (CN). Pode-se inferir

que a agressão do laser, aliada à agressão inflamatória da úlcera, geraram um padrão de marcação mais intenso para a Hsp27. Esse resultado condiz com as propriedades do laser de estimular a proliferação celular em situações de estresse (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004; KARU, 2008), uma vez que a Hsp27 se relaciona, como já comentado, tanto com a manutenção das propriedades de proliferação celular pelo controle da apoptose, quanto com a migração celular pelo controle das fibras de actina do citoesqueleto (CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003; HIRANO; SHELDEN; GILMONT, 2004; LAPLANTE et al. 1998; SAMALI et al., 2001).

Ainda enfocando a análise semiquantitativa da região mais superficial (região A), observa-se que a expressão imunoistoquímica da Hsp47 exibiu também padrão diferente diante da presença da úlcera (Tabela 5.4). O padrão se intensificou principalmente nos fibroblastos, nas células da parede vascular e no epitélio em migração em praticamente todos os períodos experimentais. A maior expressão da Hsp47 nos fibroblastos é indicativa de defesa celular pela síntese colagênica (NAGATA, 1998; TASAB; BATTEN; BULLEID, 2000), a qual é mais intensa diante do processo de reparo. A maior expressão nas células da parede vascular está relacionada a maior migração endotelial como citado por Piotrowicz, Hickey e Levin (1998). Já a marcação nos queratinócitos em migração pela Hsp47, principalmente os basais, pode estar relacionada à secreção de matriz extracelular no processo de reparação, principalmente de elementos da membrana basal como a osteonectina, laminina e o colágeno tipo IV (KUDO et al., 1994). O controle sem úlcera e sem laser (CN) exibiu um padrão de marcação para a Hsp47 similar ao descrito na literatura (NAGATA, 1998).

A expressão da Hsp47 nas estruturas citadas foi ainda mais intensa e mais precoce quando se observa o GL, principalmente nos fibroblastos e nas células da parede vascular. Esse fato se relaciona diretamente aos relatos na literatura que afirmam ser o laser de diodo, quando utilizado em baixa intensidade, um estimulador da produção de colágeno, de tecido de granulação e de reepitelização nas situações de reparo (TAYLOR et al., 1997). Assim, os mecanismos biológicos que justificam a expressão da Hsp47 como sinalizadora da produção de matriz extracelular e de vascularização estariam exacerbados quando estimulados pela irradiação laser. Vale dizer que a relação da expressão aumentada da Hsp47 com fibrose, relatada por alguns autores (VERRICO; HAYLETT; MOORE, 2001) não foi observada no presente trabalho.

Em vários trabalhos na literatura, a expressão da Hsp47 é tardia em relação ao estímulo agressor (TSUKUMI et al., 2001). Isso está ligado às propriedades de termotolerância que um tecido possui, quando estruturas moleculares armazenam a energia calórica e esta é dissipada, podendo provocar danos na síntese protéica (NAGATA, 1998). Nesse sentido o presente experimento refletiu essa tendência já que, tanto pela análise semiquantitativa quanto pela análise quantitativa, observa-se maior intensidade de expressão das Hsp27 e 47 nos períodos de 48h e 72h em ambos os grupos ulcerados.

Em termos gerais, pode-se afirmar que o laser de diodo, utilizado como ferramenta estimuladora do reparo, acarretou em maior expressão da Hsp27 e da Hsp47 na região superficial da lesão (até 0,5mm de profundidade), principalmente

considerando o tecido epitelial em migração, os fibroblastos e as células da parede vascular.

Será discutida agora a análise quantitativa da Hsp47 nas três áreas da língua, relacionando-as com o aumento de temperatura detectado.

Observa-se que o GL manteve maior número de células positivas em todas as regiões até 72h. Na área A, nota-se que essa diferença foi bastante sutil em relação ao GN, o que também se nota na análise semiquantitativa ao se verificar a expressão nos fibroblastos. É importante comentar que essa área envolve duas situações distintas de contato com o calor: a região superficial e a região até 0,5mm de profundidade. Pelo Gráfico 1 das variações de temperatura no tempo, nota-se que a região superficial tem um aumento abrupto de calor, o qual imediatamente é perdido cessada a irradiação. Se considerarmos que essa região equivale ao tecido epitelial preexistente, é possível verificar que a irradiação laser, em 0h ou nos controles, praticamente não acarretou modificação da expressão da Hsp47 pela análise semiquantitativa. Nesse sentido, pode-se depreender que o tecido epitelial possui alta termotolerância em que não foi necessário o acionamento da cascata das HSPs diante do aumento transitório e bastante breve de 6°C. O tecido epitelial constitui uma barreira mecânica e térmica bastante importante, sendo particularmente mais resistente a altas temperaturas na mucosa oral (LAPLANTE et al., 1998).

Por outro lado, considerando-se agora a profundidade de 0,5mm, pelo gráfico 5.1, nessa região o aumento da temperatura foi menor e a dissipação do calor, mais lenta. Vale dizer que a análise quantitativa envolveu a contagem de células positivas

para Hsp47 nesse nível de profundidade. Considerando então que essa energia calórica ficou em contato um pouco mais tempo no tecido nessa profundidade, provavelmente isso acarretou modificações na expressão da Hsp47, a qual se apresentou maior no GL já no tempo de 0h, tanto na análise quantitativa quanto na semiquantitativa. Os tipos celulares envolvidos nessa região diferem bastante do tecido epitelial e já naturalmente expressam a Hsp47 em situações sem agressão (TASAB; BATTEN; BULLEID, 2000), o que os tornaria mais sensíveis à estimulação dessa cascata de defesa. Como a expressão da Hsp47 é indicativa de defesa celular pela síntese colagênica (NAGATA, 1998), pode-se dizer que, em 0h e 24h após a irradiação laser, um tecido ulcerado já apresenta maior atividade proliferativa e de síntese colagênica do que um tecido ulcerado sem irradiação laser. Em 120h, o aumento quantitativo da expressão no GN (Gráfico 5.3) pode estar envolvido com uma fase de proliferação fibroblástica e de síntese/remodelamento colagênico mais tardia em relação ao GL, fato já discutido anteriormente na análise semiquantitativa.

Na área B, envolvendo cerca de 1,5 mm de profundidade, o aumento do calor foi bem menor em relação à superfície e sua dissipação mais lenta. Houve maior expressão da Hsp47 até 72h no GL, a qual pode ser justificada pelos fatos expostos no parágrafo anterior, envolvendo o acionamento tardio da cascata da HSP e as células mesenquimais naturais nesse local. É importante acrescentar que o processo inflamatório induzido pela úlcera estende-se até essa profundidade, em que fibras musculares esqueléticas são danificadas em função da exsudação celular e plasmática. Nota-se que há uma resposta de síntese colagênica em função do acionamento do processo regenerativo das fibras musculares e da reconstrução do estroma muscular.

Esse fato justificaria a existência de expressão acentuada da Hsp47 também no GN, igualando-se ao GL em 120h devido à resolução do processo inflamatório. Assim, o efeito da inflamação adicionado à ação térmica (e fotoquímica) do laser justifica a maior expressão da Hsp47 no GL em área 1,5mm abaixo do ponto de úlcera e de irradiação laser.

A área C, distante 2mm da superfície ulcerada, estava, nos cortes histológicos, livre de evidências morfológicas indicativas de processo inflamatório. Correspondeu à região da lâmina própria do dorso lingual (diametralmente oposta à úlcera), também com ligeiro aumento de calor (cerca de 2,5°C) e lenta dissipação dessa energia. Aqui houve grande oscilação da expressão da Hsp47 no GL, a qual se manteve novamente maior até 72h. Pode-se inferir que essa região também sofreu influência da irradiação laser considerando-se a alteração da temperatura e as propriedades do laser utilizado, em que a penetração do feixe laser no comprimento de 810nm é de aproximadamente 1,5 cm (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004; KARU, 2008). Contudo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os controles sem úlcera nessa região, novamente a ação do laser somada ao processo inflamatório local poderiam ser responsáveis pelas tendências expressas no gráfico 5.5. Apesar de não haver evidência morfológica da inflamação nessa região, é sabido que o órgão inteiro responde ao estímulo agressor, e que este acarreta inclusive respostas sistêmicas. Assim, a expressão de Hsp47 nos fibroblastos dessa região, tanto no GN quanto no GL, está relacionada ao recrutamento dessas células para o local agredido, mesmo que distante dela (ROCHKIND et al., 2007). Ao mesmo tempo, é possível haver modificações das taxas de penetração e absorbância de um laser em função do tecido

inflamado, bem como alteração na quantidade de cromóforos que interagem com o comprimento de laser. Por exemplo, muito edema em 24h leva a distanciamento entre as células, mudando então o padrão de absorção do laser em diferentes níveis de profundidade (KOLAROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 2002).

Como já comentado, o laser de diodo (infravermelho) atinge uma profundidade de aproximadamente 1,5 cm em modo contato (DAMANTE et al., 2008; KARU; KOLYAKOV, 2005); esperava-se que neste trabalho a profundidade fosse menor pela perda gerada pelo modo não-contato, porém como visto no teste com a câmera termográfica, houve efeito sobre a temperatura até 3mm, o que indica ação do laser nessa profundidade mesmo sem contato. As oscilações de calor nesse nível foram mínimas, porém essa hipertermia já levou a alterações na expressão das HSPs. Esse resultado também pode estar relacionado à ação fotoquímica, por transmissão dos fótons até as regiões mais distantes na profundidade da lesão, alterando a condição redox das células (muito mais importante que o aumento de ATP, pois muitas HSPs, incluindo a Hsp27, são ATP-independentes).

Assim, este experimento evidenciou que a irradiação do laser de diodo, nas condições descritas, acarretou aumento na expressão da Hsp27 e Hsp47, tanto nas regiões superficiais quanto nas regiões até 2mm de profundidade. Esse aumento pode ser interpretado como o acionamento do sistema de defesa celular contra o estresse provocado tanto pela úlcera quanto pelo laser, gerando uma resposta de defesa celular manifesto por proliferação e migração celular e por aumento de síntese protéica, principalmente colagênica.

7 CONCLUSÕES

O laser intensificou o padrão de marcação da Hsp 27 no grupo GL, em relação aos demais grupos, sugerindo que as funções desta proteína (termotolerância, proteção contra apoptose e modulação da dinâmica da actina) podem estar mais exacerbadas neste grupo.

Pela análise do padrão de expressão celular da Hsp 47 houve uma tendência a expressar, nos diversos tempos experimentais, os mesmos tipos celulares, porém com intensidades e quantidades maiores no GL em relação ao GN. Esse aumento indica que o laser estimula a defesa celular por intermédio do controle maior da síntese de colágeno.

A aplicação do laser de diodo conforme os parâmetros do trabalho levam a aumentos de temperatura até 3mm de profundidade a partir do ponto de irradiação. O que indica uma possível influência do laser não só por sua ação fotoquímica, mas também pela ação térmica.

REFERÊNCIAS³

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. *Laser Surg Med* 2001;29(2):179-84.

Arrigo A-P. Hsp27: Novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life* 2001;52(6):303-7.

Arrigo A-P, Firdaus WJ, Mellier G, Moulin, M, Paul, C, Diaz-Latoud C, et al. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods* 2005 35:126-38.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, e Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth a pilot study. *Lasers Med Sci* 2006;21:86-9.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Laser Surg Med* 1995;16(4):331-342.

Beckham JT, Mackanos MA, Crooke C, Takahashi T, O'Connell-Rodwell C, Contag CH, et al.. Assessment of Cellular Response to Thermal Laser Injury Through Bioluminescence Imaging of Heat Shock Protein 70. *Photochem Photobiol* 2004 Jan;79(1):76-85

Brioschi ML, Cimbalista Jr M, Colman D, Machuca TN, Lourdes DRR. Termo-coronário-angiografia: padronização do método e primeiras aplicações clínicas no Brasil. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2002 Abr;17(2):15-9

³ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de Periódicos segundo as bases Medline.

Brown SA, Farkas JP, Arnold C, Hatef DA, Kim J, Hoopman J, et al. Heat shock proteins 47 and 70 expression in rodent skin model as a function of contact cooling temperature: Are we overcooling our target? *Lasers Surg Med* 2007 Jul;39(6):504-12.

Bruey J-M, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000 Sep;2(9):645-52.

Campos L, Simões A, Sá PH, Eduardo CP. Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2009 Apr;27(2):371-4.

Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol* 2003;4(1):1-12.

Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 2003 Jan;8(1):61-70.

Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Laser Surg Med* 2005 Jul;37(1):46-52.

D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 Jun;103(6):764-73.

Damante, CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008 Jul 4. [Epub ahead of print]

Damante CA, Gregghi SL, Sant'Ana AC, Passanezi E, Taga R. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers Surg Med* 2004;35(5):377-84

Ebert MPA, Schäfer C, Chen J, Hoffmann J, Gu P, Kubisch C, et al. Protective role of heat shock protein 27 in gastric mucosal injury. *J Pathol* 2005;207(2):177-84.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007 Abr;39(4):365-72.

Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2003 Jul;32(6):358-66.

Gutknecht N, Franzen R. O laser: função, interação e segurança. In: Gutknecht N, Eduardo CP. *Odontologia e o Laser: Atuação do laser na especialidade odontológica*. São Paulo: Quintessence; 2004. Cap. 3, p. 25-60

Hantash BM, Bedi VP, Kapadia B, Rahman Z, Jiang K, Tanner H, et al. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007 Fev;39(2):96-107.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002 Mar;295(5561):1852-8.

Hirano S, Sheldon EA, Gilmont RR. HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell Stress Chaperones* 2004;9(1):29-37.

Janda P, Sroka R, Mundweil B, Betz CS, Baumgartner R, Leunig A. Comparison of thermal tissue effects induced by contact application of fiber guided laser systems. *Laser Surg Med* 2003;33(2):93-101.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol* 2008 Set-Out;84(5):1091-9.

Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2005 Ago;23(4):355-61.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol* 2004 Set-Out;80(2):366-72.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B* 2005 Nov;81(2):98-106.

Kolarová H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Laser Surg Med* 2002;24(3):231-5.

Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, Azoulay J, Sanders M, Chandawarkar RY. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair Regen* 2006 Mar-Apr;14(2):129-37.

Kudo H, Hirayoshi K, Kitagawa Y, Imamura S, Nagata K. Two collagen-binding proteins, osteonectin and Hsp47, are coordinately induced in transformed keratinocytes by heat and other stresses. *Exp Cell Res* 1994;212(2):219-24.

Landry J, Chrétien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat Shock Resistance Conferred by Expression of the Human HSP27 Gene in Rodent Cells. *J Cell Biol* 1989 Jul;109(1):7-15.

Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, et al. Expression of Heat Shock Proteins in Mouse Skin During Wound Healing. *J Histochem Cytochem* 1998 Nov;46(11):1291-301.

McKenzie AL. Physics of thermal process in laser-tissue interaction. *Phys. Med. Biol* 1990 Sep;35(9):1175-209.

Miyamoto NT Jr, Borra RC, Abreu M, Weckx LLM, Franco M. Immune-expression of HSP27 and IL-10 in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2008 Sep;37(8):462-7.

Monastirli A, Vourekas A, Badavanis G, Pasmatzis E, Sagriotis A, Drainas D, et al. Hsp27 Expression Coincides with Epidermal Stratification during Human Epidermal Morphogenesis. *Acta Derm Venereol* 2005;85(5):389-93.

Mounier N, Arrigo A-P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 2002 Apr;7(2):167-76.

Nagata K. Expression and Function of Heat Shock Protein 47: A Collagen-Specific Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *Matrix Biol* 1998 Feb;16(7):379-86.

Parker S. Laser-tissue interaction. *Br Dent J* 2007 Jan;202(2):73-81.

Pechan, PM. Heat Shock Proteins and cell proliferation. *FEBS Lett* 1991 Mar;280(1):1-4

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 31(4):263-67.

Piotrowicz RS, Hickey E, Levin EEG. Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration. *FASEB J* 1998 Nov;12(14):1481-90.

Rezende SA, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B* 2007 Jun 26;87(3):145-53.

Rochkind S, Leider-Trejo L, Nissan M, Shamir MH, Kharenko O, Alon M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). *Photomed Laser Surg* 2007 Jun;25(3):137-43.

Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, Zeijl Lv, Paul C, et al. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperone* 2001 Jan;6(1):49-58.

Satoh M, Hirayoshi K, Yokota S, Hosokawa N, Nagata K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein Hsp47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* 1996 Apr;133(2):469-83.

Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:145-60.

Simões A, Nicolau J, Souza DN, Ferreira LS, Eduardo CP, Apel C, et al. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate. *Clin Oral Invest* 2008 Mar;12(1):25-30.

Smith K. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Ther* 1991;3:19-24.

Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol* 2001 Feb;144(2):260-6.

Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J* 2000 May 15;19(10):2204-11.

Taylor D-L, Schafer SA, Nordquist R, Payton ME, Dickey T, Bartels KE. Comparison of a high power diode laser with the Nd:YAG laser using in situ wound strength analysis of healing cutaneous incisions. *Laser Surg Med* 1997; 21(3):248-54.

Trautinger F, Kokesch C, Herbacek I, Knobler RM, Kindas-Mügge I. Overexpression of the small heat shock protein, hsp27, confers resistance to hyperthermia, but not to oxidative stress and UV-induced cell death, in a stably transfected squamous cell carcinoma cell line. *J Photochem Photobiol B* 1997 May;39(1):90-5.

Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004 Aug;1(4):274-9.

Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase K, Okabe S. Involvement of Heat Shock Proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rat. *J Physiol Pharmacol* 2001 Sep;52(3):391-406.

Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology - role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull* 2001 Jan;24(1):1-9.

Verrico AK, Haylett AK, Moore JV. In vivo expression of the collagen-related heat shock protein Hsp47 following hyperthermia or photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2001;16(3):192-8.

Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issue concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histochemistry* 2006;49:406-10

Yeo M, Park HK, Kim DK, Cho SW, Kim YS, Cho SY, et al. Restoration of heat shock protein70 suppresses gastric mucosal inducible nitric oxide synthase expression induced by *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 2004 Nov;4(11):3335-42.

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO Protocolo 02/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa - Subcomissão de Bioética de Animais, recebeu e aceitou o adendo referente a alteração do título do projeto "Análise da expressão imunoenzimática e imuno-histoquímica das proteínas Hsp70, IL-6 e TNF- α em tecidos com úlcera induzida experimentalmente e tratados com laser diodo " para "Análise da expressão imuno-histoquímica de proteínas de choque térmico, em tecido com úlcera induzida experimentalmente e tratada com laser diodo", de responsabilidade da Pesquisadora MAYRA TORRES VASQUES, sob orientação da Professora Doutora LUCIANA CORRÊA.

São Paulo, 03 de abril de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP

Anexo B – Tabelas de dados estatísticos

Aplicação do *Teste de Kruskal-Wallis*, com o intuito de verificar-se possíveis diferenças entre os grupos estudados, quando comparados concomitantemente:

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Área_A_0h	Controle só laser	3	106,33	18,45	0,022
	Controle sem laser e sem lesão	3	42,33	10,50	
	GN	3	118,33	11,59	
	GL	3	186,67	29,87	
	Total	12	113,42	55,95	
Área_B_0h	Controle só laser	3	45,33	11,59	0,033
	Controle sem laser e sem lesão	3	24,33	3,51	
	GN	3	35,33	13,50	
	GL	3	79,00	26,21	
	Total	12	46,00	25,32	
Área_C_0h	Controle só laser	3	28,00	8,00	0,050
	Controle sem laser e sem lesão	3	33,00	12,00	
	GN	3	42,33	11,02	
	GL	3	107,33	19,73	
	Total	12	52,67	35,30	
Total_0h	Controle só laser	3	179,67	29,37	0,022
	Controle sem laser e sem lesão	3	99,67	26,01	
	GN	3	196,00	28,00	
	GL	3	373,00	72,19	
	Total	12	212,08	110,61	
Área_A_24h	Controle só laser	3	106,33	18,45	0,024
	Controle sem laser e sem lesão	3	42,33	10,50	
	GN	3	231,33	40,38	

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Área_B_24h	GL	3	293,67	84,77	0,022
	Total	12	168,42	111,49	
	Controle só laser	3	45,33	11,59	
	Controle sem laser e sem lesão	3	24,33	3,51	
	GN	3	54,67	18,04	
	GL	3	124,00	9,85	
Área_C_24h	Total	12	62,08	40,36	0,031
	Controle só laser	3	28,00	8,00	
	Controle sem laser e sem lesão	3	33,00	12,00	
	GN	3	57,00	16,52	
	GL	3	186,00	66,91	
	Total	12	76,00	73,71	
Total_24h	Controle só laser	3	179,67	29,37	0,016
	Controle sem laser e sem lesão	3	99,67	26,01	
	GN	3	343,00	55,57	
	GL	3	603,67	98,88	
	Total	12	306,50	207,66	
Área_A_48h	Controle só laser	3	106,33	18,45	0,024
	Controle sem laser e sem lesão	3	42,33	10,50	
	GN	3	302,00	78,54	
	GL	3	287,33	62,50	
	Total	12	184,50	125,47	
Área_B_48h	Controle só laser	3	45,33	11,59	0,022
	Controle sem laser e sem lesão	3	24,33	3,51	
	GN	3	62,67	19,66	
	GL	3	124,00	3,00	
	Total	12	64,08	40,06	
Área_C_48h	Controle só laser	3	28,00	8,00	0,027
	Controle sem laser e sem lesão	3	33,00	12,00	
	GN	3	48,00	4,36	
	GL	3	94,33	6,51	
	Total	12	50,83	28,22	

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Total_48h	Controle só laser	3	179,67	29,37	0,019
	Controle sem laser e sem lesão	3	99,67	26,01	
	GN	3	412,67	72,89	
	GL	3	505,67	59,00	
	Total	12	299,42	178,24	
Área_A_72h	Controle só laser	3	106,33	18,45	0,024
	Controle sem laser e sem lesão	3	42,33	10,50	
	GN	3	313,33	41,20	
	GL	3	339,33	25,15	
	Total	12	200,33	135,92	
Área_B_72h	Controle só laser	3	45,33	11,59	0,017
	Controle sem laser e sem lesão	3	24,33	3,51	
	GN	3	70,00	15,39	
	GL	3	122,00	6,08	
	Total	12	65,42	39,06	
Área_C_72h	Controle só laser	3	28,00	8,00	0,023
	Controle sem laser e sem lesão	3	33,00	12,00	
	GN	3	67,33	9,81	
	GL	3	146,00	8,19	
	Total	12	68,58	49,97	
Total_72h	Controle só laser	3	179,67	29,37	0,016
	Controle sem laser e sem lesão	3	99,67	26,01	
	GN	3	450,67	29,87	
	GL	3	607,33	23,59	
	Total	12	334,33	214,72	
Área_A_120h	Controle só laser	3	106,33	18,45	0,016
	Controle sem laser e sem lesão	3	42,33	10,50	
	GN	3	442,00	77,79	
	GL	3	271,00	75,03	
	Total	12	215,42	168,72	
Área_B_120h	Controle só laser	3	45,33	11,59	0,081
	Controle sem laser e sem lesão	3	24,33	3,51	

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
	lesão				
	GN	3	55,33	10,02	
	GL	3	59,33	16,20	
	Total	12	46,08	17,12	
Área_C_120h	Controle só laser	3	28,00	8,00	
	Controle sem laser e sem lesão	3	33,00	12,00	
	GN	3	92,67	9,61	0,031
	GL	3	50,00	6,00	
	Total	12	50,92	27,70	
Total_120h	Controle só laser	3	179,67	29,37	
	Controle sem laser e sem lesão	3	99,67	26,01	
	GN	3	590,00	68,46	0,016
	GL	3	380,33	75,06	
	Total	12	312,42	203,91	