

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências
da Saúde**

Luiz Gustavo Balaguer Cruz

**COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DO USO DE DICLOFENACO DE
SÓDIO E O LASER DE BAIXA POTÊNCIA (830NM) NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO EM PELE DE RATOS: ASPECTOS
BIOMECÂNICOS E HISTOLÓGICOS.**

São Paulo, SP

2014

LUIZ GUSTAVO BALAGUER CRUZ

**COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DO USO DE DICLOFENACO DE
SÓDIO E O LASER DE BAIXA POTÊNCIA (830NM) NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO EM PELE DE RATOS: ASPECTOS
BIOMECÂNICOS E HISTOLÓGICOS.**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biofotônica Aplicada às Ciências
da Saúde da Universidade Nove de
Julho, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Saúde

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

**São Paulo, SP
2014**

Cruz, Luiz Gustavo Balaguer.

Comparação entre o efeito do uso de diclofenaco de sódio e o laser de baixa potência (830nm) no processo de cicatrização em pele de ratos: aspectos biomecânicos e histológicos. Luiz Gustavo Balaguer Cruz. 2015. 74 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

1. Cicatriz. 2. Laserterapia. 3. Colágeno. 4. Propriedades mecânicas. 5. Diclofenaco de sódio

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título

CDU 615.813

São Paulo, 16 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): LUIZ GUSTAVO BALAGUER CRUZ

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa potência (830 nm) no processo de cicatrização em pele de ratos. Aspectos biomecânicos e histológicos"

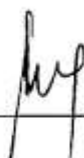
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO



Membro: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES



Lista de Abreviaturas

CTL - Controle

NT - Cicatriz sem tratamento

DIC - Cicatriz + anti-inflamatório

L3J - cicatriz + laser 3J

L+D - cicatriz + associação laser 3J e diclofenaco de sódio

FDA - Food and Drug Administration norte-americano

PGE2 - prostaglandina E2

IL1- β - Interleucina-1 beta

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBP – Laser de Baixa Potência

MMP – Metaloproteinase da Matriz

mW – MiliWatt

nm– Nanômetro

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

I.M. – intramuscular

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

ANOVA - análise de variância

cm² - Centímetro quadrado

λ - Comprimento de onda

DE - Densidade de energia

DP - Densidade de potência

J – Joule

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

Kg – Kilograma

Mm – Milímetros

F_{max} - Força de ruptura máxima

D_{max} - Descolamento no momento da ruptura máxima

K_s - Rigidez secante

°C – graus célsius

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração das camadas da pele e suas principais estruturas.....	17
Figura 2: Ilustração do sítio operatório no dorso do rato.....	25
Figura 3: Esquema dos grupos experimentais.....	27
Figura 4: Tabela com os parâmetros de irradiação laser.....	27
Figura 5: Foto do tecido acoplado ao aparelho de ensaio mecânico (EMIC2000)....	29
Figura 6: Imagens histológicas da pele por HE.....	32
Figura 7: Imagens histológicas da pele por Picrosirius red.....	34

Lista de Gráficos

Gráfico 1A: Gráfico do ensaio de tração forças de carregamento e descarregamento.....30

Gráfico 1B: Gráfico do ensaio de tração, curva simplificada no momento da ruptura.....30

Gráfico 2: Gráfico da relação entre a força máxima de tração e o deslocamento máximo durante o momento de ruptura do tecido.....35

Anexos:

Submissão do artigo "EFFECT OF LOW LEVEL LASER (830NM) IN THE HEALING
PROCESS IN RAT SKIN. BIOMECHANICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS." À
revista "Lasers in medical sciences"52

RESUMO

Cruz, LGB. Comparação entre o efeito do uso de diclofenaco de sódio e o laser de baixa potência (830NM) no processo de cicatrização em pele de ratos: Aspectos biomecânicos e histológicos. 74 f.

A pele é um tecido de revestimento que sofre permanente ação do ambiente, muitas vezes de forma agressiva, levando a lesão deste tecido. Geralmente em seu processo de reparo ocorrem alterações estruturais que evoluem para o desenvolvimento de uma cicatriz. Neste caso o tecido pode apresentar alterações morfológicas que interferem em suas propriedades mecânicas e este processo de reparo produz um tecido com propriedades diferentes do tecido original. Dessa forma, a utilização de terapias que favoreçam esta reparação é importante para buscar uma qualidade melhor da cicatriz. A terapia com laser de baixa potência aparece como um recurso utilizado na modulação do processo inflamatório auxiliando no processo de reparo da pele. O Objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia com laser de baixa potência de 830nm, com 100mW de potência nas energias de um 1J e 3J comparativamente ao efeito do diclofenaco de sódio tópico no processo de reparo da pele de ratos, após a indução de uma lesão controlada, observando aspectos histológicos e biomecânicos. Foram utilizados ratos wistar, entre 150g à 200g, com 3 meses de idade. Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e xilazina (90mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, injeção intraperitoneal). Depois de anestesiados, foram realizadas 2 lesões cortantes utilizando um bisturi cirúrgico, no dorso do animal. Os animais foram divididos em 5 grupos de 5 animais: Controle (CTL), Cicatriz sem tratamento (NT), Cicatriz + Diclofenaco de sódio tópico (DIC), cicatriz + laser 1J (L1J) e cicatriz + laser 3J (L3J). O tratamento farmacológico e a terapia laser foram realizados imediatamente após a indução da lesão e mantida a irradiação diária até o sétimo dia. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados com hiperdosagem do mesmo anestésico e o tecido foi imediatamente retirado para análises histológicas e de ensaios de tração. Resultados: Tanto o grupo NT quanto o grupo DIC apresentaram redução das propriedades mecânicas e alterações nas análises histológicas. O grupo tratado L1J e o grupo L3J apresentaram significativa melhora das propriedades mecânicas e na organização histológica. O grupo L1J apresentou resultados histológicos e biomecânicos próximos ao tecido saudável do grupo CTL. Conclusão: Concluímos que a utilização do diclofenaco de sódio tópico não conseguiu melhorar as características histológicas e biomecânicas da pele após a indução da lesão. A terapia com laser de baixa potência foi eficaz na melhora destas propriedades, sugerindo um melhor reparo tecidual. Porém, mais estudos devem ser realizados visando entender a proporção e organização das fibras de colágeno ou mesmo o estudo de tempos de reparo superiores ao utilizados neste estudo.

Palavras-chave: Cicatriz, Laserterapia, Colágeno, Propriedades mecânicas, Diclofenaco de sódio

Abstract

The skin is a coating tissue which undergoes permanent environmental action, often in aggressive forms, causing damage to this tissue. Generally, in the repair process structural changes occur which progress to the development of a scar. In this case the tissue may present morphological changes that interfere with its mechanical properties and this repair process produces a tissue with different properties than of the original tissue. Therefore, the use of therapies that favor this repair is important to seek a better scar quality. Low-level laser therapy appears as a resource used in the modulation of the inflammatory process helping the skin repair process. The objective of this study was evaluate the effect of low level laser (830nm) with 100 mW of potency using 1J or 3J of energy comparing to the effect of the topical sodium diclofenac on the repair process of the rat's skin after induction of injury, analyzing the biomechanical behavior and histological changes of skin, 28 days after the harmful process. Male Wistar rats between 150g to 200g, 3 months old were used. The animals were anesthetized with association of xylazine hydrochloride and ketamine (90mg / kg and 10mg / kg, respectively, intraperitoneal injection). Once anesthetized, 2 lesions were performed using a surgical scalpel at the dorsal area of the animal. The animals were divided into 5 groups of 7 animals: control (CTL), untreated scar (NT), scar + anti-inflammatory (DIC), scar + 1J laser (L1J) and scar + 3J laser (L3J). The pharmacological treatment and laser therapy were performed immediately after lesion induction and maintained daily irradiation until day 7. After 28 days, the animals were euthanized with an overdose of the same anesthetic and the tissue was immediately removed for histological analysis and traction trials. Results: Both the NT and group DIC showed a reduction of mechanical properties and alterations in histology analysis. L1J group showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. We conclude that laser therapy improves certain mechanical properties of skin in this lesion model. However, more studies should be conducted to understand the proportion and organization of collagen fibers I and III biochemically. Either the study can be longer and evaluate the scars after the remodeling process.

Key words: Scar, Healing, LLLT, Collagen, Mechanical Properties, Sodiun Diclofenac.

INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Pele.....	16
1.2 Reparo Tecidual (Cicatrização).....	17
1.3 Colágeno e Propriedades Mecânicas da Pele.....	19
1.4 Tratamento de feridas – Estágio atual.....	20
1.5 Laser.....	21
2- OBJETIVO.....	24
2.1 Gerais.....	24
2.2 Específicos.....	24
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Indução da Cicatriz.....	25
3.3- Grupos Experimentais.....	26
3.4- Parâmetros da Forma de Aplicação da Terapia com Laser de Baixa Potência (LPB).....	27
3.5- Propriedades Mecânicas da Pele.....	28
3.6- Preparação Histológica das Amostras.....	31
3.7- Análise Estatística.....	31
4- RESULTADOS.....	32
5- DISCUSSÃO.....	36
6- CONCLUSÃO.....	42
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

8- ANEXOS.....	52
-----------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano representando mais de 15% do peso corpóreo do indivíduo. O fato de ser um órgão de revestimento faz com que a pele esteja sujeita a agressões durante todas as fases de vida do ser humano, sendo frequente a preocupação em protegê-la afim de evitar complicações relacionadas à sequelas, comprometendo muitas vezes a atividade normal do indivíduo, levando ao afastando do trabalho ou a aposentadoria precoce por invalidez (BLANES *et al*, 2004).

A incidência e prevalência destas lesões são extremamente altas e se não forem tratadas podem evoluir para um estado crônico. Assim, vários fatores podem influenciar no atraso ou alteração do reparo tecidual, dentre eles temos: o processo de envelhecimento, doenças cardiovasculares, diabetes, neoplasias, hipotireoidismo, alterações nutricionais, como desnutrição, deficiências vitamínicas e o uso excessivo de medicamentos (FREITAS *et al*, 2002).

Estes fatores têm mobilizado a indústria farmacêutica e de cosméticos a desenvolverem produtos específicos e, sobretudo, adequados para cada tipo de lesão cutânea (BUFALARI *et al*, 1996; BIONDO-SIMÕES *et al*, 2005).

Somente na Europa, são gastos 750 milhões de euros ao ano no tratamento de feridas (EWMA). Nos Estados Unidos, este valor chega a 600 milhões de dólares ao ano (WUWHS). No Brasil, não há dados estatísticos precisos sobre o número de portadores de feridas cutâneas crônicas, mas sabe-se que sua cronificação tem um impacto psíquico, social e econômico na população, representando a segunda causa de afastamento do trabalho (MONTENEGRO *et al*, 1999). Tais fatos justificam a necessidade de estudos cada vez mais abrangentes neste tema, visando minimizar o estigma social e econômico que este problema causa atualmente em nosso país.

1.1 Pele

A pele desempenha inúmeras funções de vital importância constituindo uma barreira de proteção para as estruturas internas do organismo às agressões de agentes externos de qualquer natureza. Ao mesmo tempo impede perdas de água e eletrólitos mantendo o equilíbrio ácido básico do organismo. Atua também na termorregulação através da sudorese, constrição e dilatação da rede vascular cutânea, proporcionando o controle homeostático de nosso corpo (GUYTON *et al*, 2002).

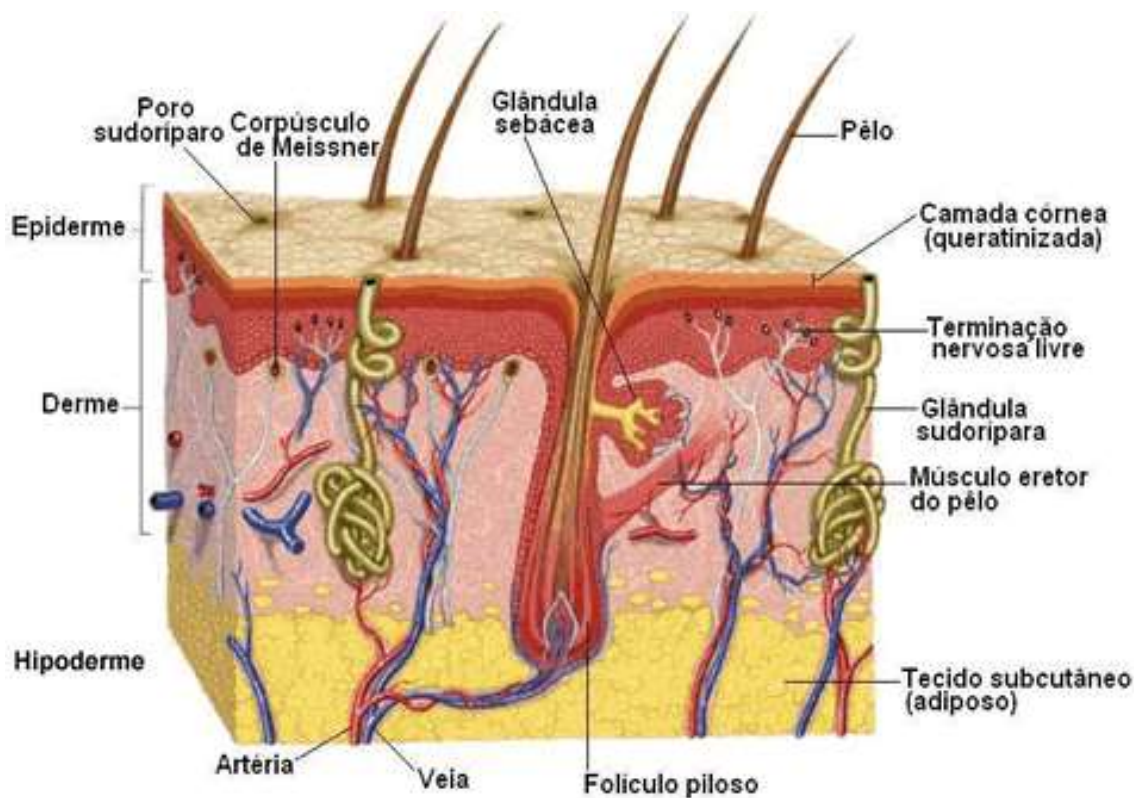
Este tecido é um órgão complexo, formado por um epitélio de superfície chamado de epiderme, seguido por uma camada de tecido conjuntivo subjacente, chamado derme e por uma terceira camada intimamente ligada à fáscia profunda, conhecida como hipoderme (figura 1). Os limites entre as porções de tecido epitelial e conjuntivo da pele são bem descritos, onde alguns elementos fibrosos da derme misturam-se com os da hipoderme. (COTRAN *et al*, 2000).

A epiderme é a camada mais superficial, sendo constituída por epitélio estratificado, cuja espessura pode variar de 0,04mm (pálpebras) até 1,6mm (palmas e plantas).

A derme ou cório é a segunda camada, mais profunda e composta por tecido estromal denso de característica fibroelástica, onde encontraremos outras estruturas como redes vasculares, redes nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e folículos pilosos.

A terceira camada e mais profunda das três é a hipoderme e é composta de tecido adiposo, havendo controvérsias em considerá-la uma componente da pele (GRAY *et al*, 1988).

Esta divisão da pele em camadas é didática e devido a sua ampla extensão e ao fato de ser o revestimento de áreas bem peculiares do corpo humano, podem-se encontrar variações estruturais, citológicas e histológicas, quando são avaliadas amostras de pele de diferentes áreas do corpo humano (SAMPAIO *et al*, 2001).



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br>

Figura 1: Ilustração das camadas da pele e suas principais estruturas

1.2 Reparo Tecidual (Cicatrização)

A pele possui inúmeras estruturas que, quando acometidas durante um processo lesivo, podem perder suas características e propriedades específicas pela formação de um tecido cicatricial. A reparação tissular / celular é um evento fisiológico que se inicia a partir de uma resposta inflamatória, sendo um processo sistêmico e dinâmico, relacionado diretamente as condições gerais do organismo (MODOLIN e BEVILACQUA *et al*, 1985; CANDIDO *et al*, 2001).

Esta descontinuidade na integridade do tecido pode ser causado por patologias, traumas ou por procedimentos cirúrgicos que induzirá a liberação de substâncias químicas que participam do processo inflamatório agudo, provocando alterações no tecido como migração celular, proliferação de células estromais, síntese de matriz extracelular direcionando à remodelação do tecido ora lesionado (GILLITZER *et al*, 2001; MEDRADO *et al*, 2008).

A cicatrização pode ser dividida em hemostasia, migração (inflamatória), proliferação e remodelação. Durante a hemostasia ocorre o controle do sangramento, onde as plaquetas formarão coágulos para conter o sangramento, além de liberarem fatores quimiotáticos na corrente sanguínea. Na fase inflamatória ocorre o aumento da permeabilidade vascular, permitindo a passagem de plasma, eritrócitos e leucócitos para o local da lesão. A intensidade da fase inflamatória está relacionada ao tipo e grau de lesão tecidual (GUYTON *et al*, 2002; VILELA *et al*, 2006).

Na fase proliferativa ocorrerá à multiplicação no número de células das linhagens celulares que estão na região, sobretudo de fibroblastos que junto com a produção de elementos estruturais ajudarão no preencher da lesão. Este fato favorece o reparo do tecido conectivo e do epitélio, formando um tecido de granulação com aspecto granuloso e avermelhado (RESENDE *et al*, 2005).

A atividade mitótica do fibroblasto é reduzida após 2 semanas da lesão e as células começam a secretar colágeno, além de outras substâncias fundamentais. Nesta fase inicia-se a formação do epitélio auxiliada pela divisão e migração de células da camada basal da epiderme para a área de reparo do tecido conjuntivo subjacente. (CARVALHO *et al*, 2003).

Na última fase, a remodelação, as células fagocitárias irão absorver os tecidos em excesso. Determinadas collagenases e proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas darão direção correta às fibras colágenas difusas, produzindo, assim, a cicatriz final. Nesta fase ocorrerá a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a cicatriz se tornará menos espessa, passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (GUYTON *et al*, 2002).

No processo de regeneração o tecido se restabelece, ou seja, será recriado. Dessa forma, o processo de reparo tecidual (cicatrização) e a regeneração devem ser consideradas como eventos distintos. Podem ocorrer em conjunto, a fim de manter ao máximo a estrutura anatômica e a função da região afetada. Este fenômeno envolve vários fatores e o desequilíbrio ou a ausência de compostos (mediadores inflamatórios, elementos figurados do sangue, matriz extracelular e células parenquimatosas), principalmente os envolvidos na formação do colágeno, compromete o resultado final da cicatrização. (NASCIMENTO *et al*, 2001; AZEVEDO *et al*, 2004; BLANES *et al*, 2004).

1.3 Colágeno e Propriedades Mecânicas da Pele

Lesões na pele, induzidas por traumas, procedimentos cirúrgicos, queimaduras ou infecções, estimulam a liberação de várias substâncias químicas que participam do processo inflamatório agudo, provocando alterações no tecido como migração celular, proliferação de células estromais, síntese de matriz extracelular, direcionando para a remodelação do tecido lesionado. Estas lesões podem acometer várias estruturas levando a uma descontinuidade da integridade e alteração de propriedades específicas do tecido (GILLITZER, 2001; MEDRADO, 2008).

As alterações das propriedades mecânicas da pele após um processo lesivo ou tratamento começaram a serem descritas a vários anos atrás, quando foi demonstrado a importância do colágeno na melhora da resistência do pele (Holm-Pedersen, 1972; Oxlund 1979). O colágeno sintetizado pelas células tem uma importância fundamental na constituição da matriz extracelular no tecido conjuntivo, sendo responsável por suas propriedades físicas. O colágeno pode formar fibras com organizações específicas dependendo do tecido biológico e esta organização pode sofrer perturbações importantes após o processo lesivo (Kjaer 2009).

Estas alterações quantitativas e qualitativas do colágeno interferem diretamente nas propriedades mecânicas do tecido biológico (Jorgensen 1996). Desta forma, não apenas sua concentração como também a proporção do tipo de colágeno, bem como a organização destas fibras podem alterar a resistência do tecido (YIN 2013, MARCOS 2014).

Atualmente, o colágeno é bastante estudado em associação com biomateriais na engenharia de tecidos, apresentando resultados promissores como bio-substitutos de diversos tecidos, entre eles ossos, tendões, vasos e pele (YOU C, 2013; WANG X, 2013). No entanto o colágeno pode sofrer ação de enzimas específicas que promovem sua biodegradação, reduzindo de forma significativa suas propriedades mecânicas (GARCIA Y, 2008). Porém, apesar de ser conhecida a importância do colágeno nas propriedades mecânicas do tecido, alguns fatores como sua proporção, distribuição e organização ainda não foram totalmente esclarecidas.

1.4 Tratamento de feridas – Estágio atual

Existem muitas terapias para o tratamento de lesões cutâneas e as mais recentes caminham em direção ao uso de tecnologias mais limpas que promovam a cicatrização e gerem pouco resíduos contaminantes.

A oxigênio-terapia hiperbárica é uma técnica a partir de métodos físicos, bastante utilizada e difundida em vários países e consiste na utilização do oxigênio que submetido a uma alta pressão pode aumentar sua difusão no sangue, estimulando tanto elementos celulares quanto o próprio plasma, conseguindo desta maneira hiperoxigenar as áreas lesadas.(KRANKE *et al*,2012).

Outra terapia que utiliza curativos à vácuo para criar uma pressão negativa, conhecida como terapia de pressão sub-atmosférica, mesmo sendo utilizada desde a década de 90, anda estão em fase de implementação em várias regiões do mundo. Trata-se de um curativo (esponja, gaze, espuma) acondicionado a um sistema fechado sob o leito da lesão ligado através de uma mangueira a uma bomba que gera pressão negativa. Promove-se desta maneira a sucção dos líquidos produzidos na ferida além de tracionar centripetamente as bordas da lesão levando a diminuição de seu tamanho além de promover a chegada de células, oxigênio e outros importantes fatores endógenos para o leito da ferida, promovendo desta forma o reparo tecidual.(ORGILL *et al*,2011; BAYER *et al*,2011).

Em geral, as terapias utilizadas atualmente visam tanto a remoção do tecido lesionado quanto o estímulo de um novo tecido que atenda as exigências anatômicas e funcionais da pele. No entanto, são poucas as terapias que apresentam como resultado um tecido cicatricial com propriedades mecânicas próximas ao tecido original, justificando a necessidade do estudo de novas terapias que possam promover este rearranjo do tecido epitelial.

1.5 Laser

O emprego da laserterapia no processo de reparo tecidual foi estudado, pela primeira vez em 1966 em Budapeste no “Summelweiss Hospital” por E. Mester, que publicou os resultados de seus estudos sobre o efeito bioestimulador do Laser em pele de ratos (MESTER *et al*, 1985). Posteriormente, foi realizado estudo “in vitro” utilizando laser de baixa potência em fibroblastos, sendo observado um aumento da proliferação celular (VAN BREUGEL *et al*, 1992; POGREL *et al*, 1997). Neste mesmo ano, Neiburger publicou outro trabalho, mostrando a ação do laser de baixa potência no modelo de feridas em pele de ratos, onde observou que estas lesões cicatrizavam de forma mais rápida quando o grupo era irradiado com laser de baixa potência, principalmente nos primeiros dias após a lesão. (NEIBURGER *et al*, 1997).

Estes primeiros estudos, utilizando o laser de baixa potência no reparo tecidual, permitiram que esta terapia fosse aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1997 para tratamento de dor e como um importante método de promoção do processo de cicatrização em 2001. (ROCHA JUNIOR *et al*, 2007).

Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos e em animais foram realizados, fazendo com que a laserterapia seja considerada uma alternativa terapêutica no processo de cicatrização (DAWOOD *et al*, 2013; DA SILVA *et al*, 2013; MESTER *et al*, 2013; AVCI *et al*, 2013; DE MELO RAMBO *et al*, 2014; KHOO *et al*, 2014).

De forma geral, considera-se que este reparo tecidual se deve a modificações histológicas, através da redução do infiltrado inflamatório, da formação de tecido de granulação de melhor qualidade, do estímulo a epitelização, do aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de matriz extracelular rica em colágeno. Todos estes fatores somados com a neovascularização, contribuiriam para uma maior expressão e melhor alinhamento das fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial. (PUGLIESE *et al*, 2003; CARVALHO *et al*, 2003; ROCHA *et al*, 2006).

Inicialmente, o laser teria ação ainda na fase inflamatória, ativando queratinócitos e aumentando a síntese de colágeno promovendo a resolução do processo inflamatório. Estes processos facilitariam o reparo tecidual, contribuindo para a melhora na qualidade histológica do tecido (SILVA, E.B. *et al*, 2013).

Trabalhos recentes também mostraram um potencial efeito reparador do laser, de baixa potência no incremento das expressão de colágeno tipo I e na reorganização destas fibras (OLIVEIRA *et al*, 2009; FIÓRIO *et al*, 2014).

Alguns estudos mostram indícios sobre qual seria o mecanismo de ação dos lasers de baixa potência no processo de cicatrização. Existem evidências que o laser pode reduzir a expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios como PGE2, IL1- β , TNF- α e aumentar a expressão de outros mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (FUKUDA *et al*, 2013; DE MELO RAMBO *et al*, 2014; LIMA AA *et al*, 2014).

O uso do laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas collagenases (MMPs) e, conseqüentemente, reduzir a degeneração do tecido, favorecendo o rearranjo das fibras de colágeno. Todo este processo leva a uma melhora nas condições biomecânicas principalmente em tecidos pouco vascularizados durante o processo de reparo (BJORDAL *et al*, 2006; PIRES *et al*, 2011; GUERRA *et al*, 2013; MARCOS *et al*, 2014).

A literatura, a respeito da terapia com laser de baixa intensidade na aceleração da cicatrização de feridas é muito controversa. Uma parte dos estudos mostram resultados positivos, enquanto outra parte mostra pouco ou nenhum efeito neste processo de reparo. As disparidades podem estar relacionadas aos diferentes protocolos utilizados pelos autores e a não padronização na descrição dos parâmetros utilizados conforme descrito em revisão sobre o tema (DAMANTE *et al*, 2008; CARVALHO, RLDP *et al*, 2010).

Em relação ao comprimento de onda, os primeiros estudos demonstraram que o laser no comprimento de onda vermelho apresentaria maior eficácia no reparo de feridas quando comparado ao infravermelho (RYDÉN *et al*, 1994; CONLAN *et al*, 1996). Ao contrário, Reddy e colaboradores publicaram um trabalho onde o laser infravermelho promoveu um incremento na resistência à tração em pele de ratos diabéticos (REDDY *et al*, 2003).

Atualmente, acredita-se que o laser possui uma ação moduladora no processo inflamatório podendo tanto bioestimular quanto bioinibir a cicatrização. A reparação tecidual depende de diversos parâmetros de irradiação, tais como: comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, número de aplicações do Laser, tempo de tratamento e o tecido a ser tratado. Porém, ainda não existe um consenso

estabelecido em relação à dosimetria ideal a ser administrada para cada tipo de tratamento ou para cada patologia ou processo a ser abordado (LINS *et al*, 2010; ABREU *et al*, 2011).

Tendo em vista que o laser de baixa intensidade diminui a resposta inflamatória, melhora o reparo tecidual, melhora a qualidade e a orientação das fibras de colágeno conforme apresentado anteriormente através dos estudos citados no texto e sabendo que a terapia farmacológica considerada como terapia tradicional para processo inflamatório pós cirúrgico atualmente consiste no uso de anti-inflamatórios não hormonais, desenvolvemos um protocolo que visa estudar os aspectos histológicos e biomecânicos do efeito do laser de baixa potência no processo de cicatrização da pele de ratos comparado com o uso do diclofenaco de sódio em sua forma tópica, em um modelo de incisão cirúrgica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar os efeitos da ação do laser de baixa potência (830nm) no reparo tecidual após indução de lesão na pele de ratos.

2.2 Específicos:

- Analisar o comportamento mecânico da pele, 28 dias após o processo lesivo e a ação da terapia farmacológica tópica e laserterapia no reparo tecidual.
- Observar as alterações histológicas na pele 28 dias após a lesão e a ação da terapia farmacológica tópica e laserterapia no reparo tecidual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos Wistar, machos, pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho sob o número (AN0045/2014).

3.2 Indução da cicatriz

Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de xilazina e quetamina (90mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, injeção intraperitoneal). Após a anestesia, foram realizadas 2 incisões cirúrgicas longitudinais de 12 mm na região central do dorso no animal, utilizando um bisturi cirúrgico nº 15.



Figura 2: Ilustração do sítio operatório no dorso do rato.

Os animais foram divididos em 5 grupos de 7 animais, conforme indicado abaixo nos grupos experimentais. O tratamento farmacológico tópico e a terapia laser foram realizados imediatamente após a indução das incisões e mantidos, diariamente até o sétimo dia. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados com hiperdosagem do mesmo anestésico e dois retalhos na região dorsal contendo o local da incisão foram

retirados, para análises histológicas e de ensaios de tração. Cada retalho teve como dimensões, 15 mm de comprimento (paralelo ao craniocaudal do animal) e 5 mm de largura (perpendicular ao eixo craniocaudal).

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em diferentes grupos conforme descrito abaixo:

- Grupo Controle (C): Animais com pele íntegra (N=7).
- Grupo com lesão e não tratado (NT): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e sem nenhum tipo de tratamento, sacrificados após 28 dias a partir da indução da corte. (N=7).
- Grupo com lesão e tratado com diclofenaco de sódio tópico (DIC): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com diclofenaco de sódio tópico. O primeiro tratamento foi realizado imediatamente após a indução do corte na pele do animal e repetido diariamente até o sétimo dia do início da lesão. A pomada foi aplicada no local da lesão recobrando toda a cicatriz. (N=7).
- Grupo Irradiado (L1J): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com laserterapia no comprimento de onda de 830nm, 1J de energia, 100mW de potência, DE = 31,71 J/cm² e tempo por ponto 10 s. (N=7).
- Grupo Irradiado (L3J): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com laserterapia no comprimento de onda de 830nm, 3J de energia, 100mW de potência, DE = 107,14 J/cm² e tempo por ponto 30 s. (N=7).

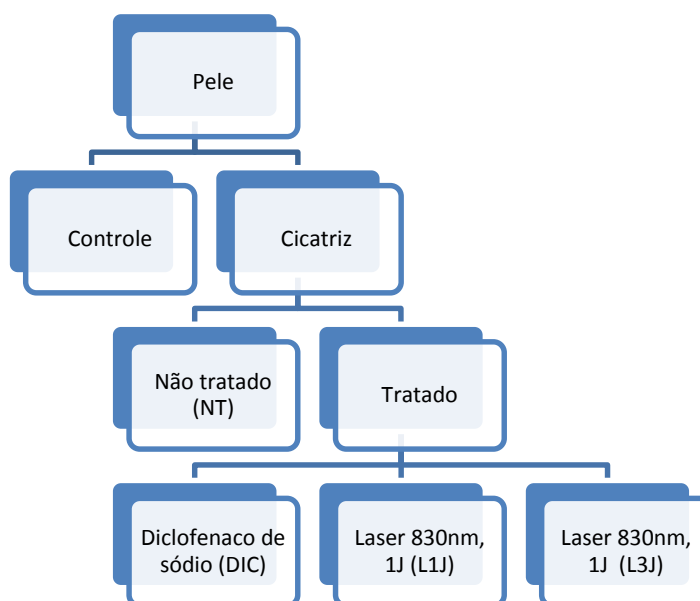


Figura 3. Esquema dos grupos experimentais

3.4 Parâmetros da forma de aplicação da Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP).

Após serem submetidos ao modelo de indução da cicatriz pelo corte com bisturi metálico, os animais dos grupos irradiados receberam o tratamento com laser de baixa potência 830nm (infravermelho), potência de 100 mW e com energias de 01 ou 03J. O diâmetro do feixe de saída foi de 0,028cm² (Thera Laser, DMC®). As irradiações foram pontuais, perpendiculares ao local da cicatriz (90°) por contato em um ponto único no centro da lesão, durante os 7 dias estabelecidas pelo protocolo.

Grupo	Comprimento de onda (nm)	Tipo de Diodo	Potência (mW)	Diâmetro do feixe (cm ²)	Densidade de potência (W/cm ²)	Energia (J)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Tempo por ponto(s)
L1J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	1	35.71	10
L3J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	3	107.14	30

Figura 4: Tabela com os parâmetros de irradiação laser.

3.5 Propriedades Mecânicas da Pele

Os animais de todos os grupos foram sacrificados após 28 dias do início do tratamento. Dois retalhos da pele da região dorsal de cada animal, onde foram realizadas as incisões cirúrgicas, foram removidos para posteriores análises, com as dimensões de 5 mm de largura e 15 mm de comprimento.

Durante a atividade normal da pele um conjunto de tensões é aplicado no tecido podendo ser divididas em forças de carregamento (tração) e descarregamento (retração). Desta forma, foi aplicado uma sequência de forças de carregamento e descarregamento, a fim de simular as condições de tensões reais da pele.

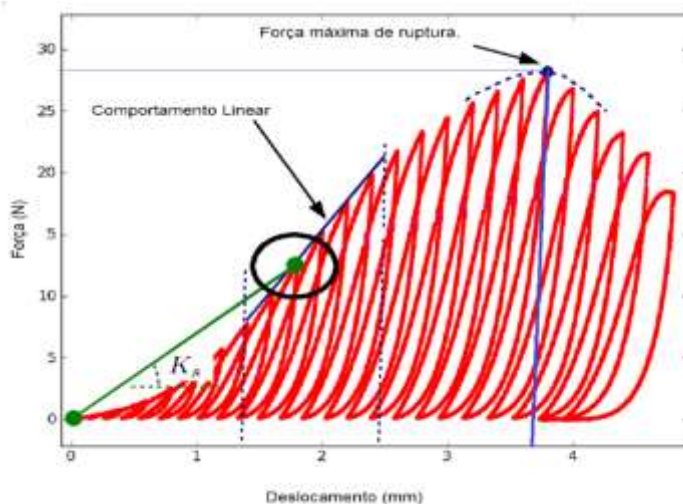
Os retalhos retangulares (5mm X 15mm) foram fixados em grampos ou pinças específicas, na máquina de tração (EMIC 200), longitudinalmente de forma que a região da cicatriz ficasse disposta de forma transversal (Figura 5).

Foi utilizado velocidade de carregamento e descarregamento de 6mm/min com um aumento de 0,5mm por ciclo, até a ruptura. Vários testes de carregamento e descarregamento de forças foram realizados até o momento da ruptura do tecido, conforme indicado no gráfico 1A (MARCOS, *et al* 2014).



Figura 5: Foto do tecido acoplado ao aparelho de ensaio mecânico (EMIC2000).

A



B

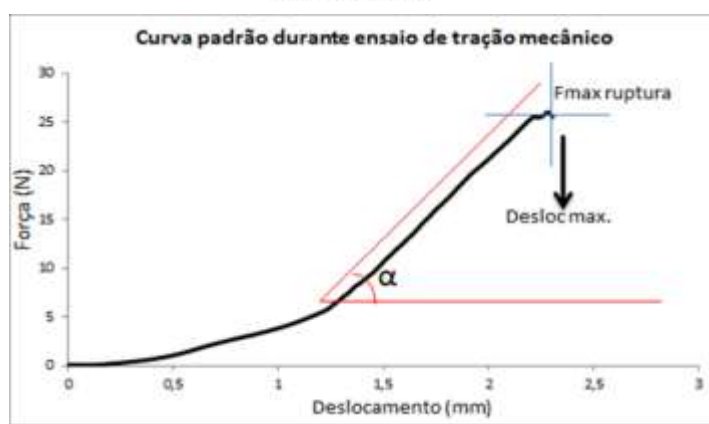


Gráfico 1A: Ensaio de Tração: Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento.

Gráfico 1B: Ensaio de Tração: Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.

O teste de tração mecânico foi interrompido automaticamente, após a ruptura do tecido e foram analisados os seguintes parâmetros:

- Força de ruptura máxima (F_{\max})
- Descolamento no momento da ruptura máxima (D_{\max})
- Rigidez (α)

3.6 Preparação Histológica das Amostras

As amostras de pele passaram por preparações histológicas padrão, começando pela fixação do tecido em formol (10%) durante 24h. Logo após as peles foram lavadas em água corrente e então desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), 1h em cada solução. Em seguida as peles foram diafanizadas em solução de álcool/xilol 1:1 por 1h, e passaram por 2 banhos de xilol puro, 1h cada. As peles foram retiradas do xilol e colocadas imediatamente em parafina líquida (60°C), dentro de uma estufa, por 2h. Posteriormente, os blocos foram confeccionados para obtenção dos cortes histológicos. As peles inclusas nos blocos de parafina foram cortadas longitudinalmente em cortes na espessura de 5µm e transferidos para lâminas histológicas, onde foram desparafinizadas e hidratadas. Foram utilizadas 2 colorações: 1ª) Hematoxilina e Eosina, para possibilitar a visualização de determinadas estruturas como vasos sanguíneos, células e matriz extracelular, 2ª) Picrosirius red, para visualização de colágeno.

As imagens foram obtidas em microscópio NIKON EP200 com lente de polarização acoplada ao redutor e a fonte de luz do microscópio para as imagens com luz polarizada e sem a lente para as imagens com HE.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram descritos em valores médios com os respectivos desvios padrão. Foram analisados tanto em seus valores absolutos, como a sua variação em percentual, à partir dos valores obtidos nas análises biomecânicas. Para os dados paramétricos, foi utilizado o teste de ANOVA com post-hoc Tukey-Kramer. O nível de significância estatístico foi para $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

A partir dos experimentos realizados, conseguimos plotar os seguintes gráficos e imagens indicados abaixo:

A figura 6 mostra a sequência histológica dos diversos grupos, saudável e lesionados, com os diferentes tratamentos. É possível observar a presença de vasos (seta vermelha) e de fibroblastos (seta preta) no tecido epitelial.

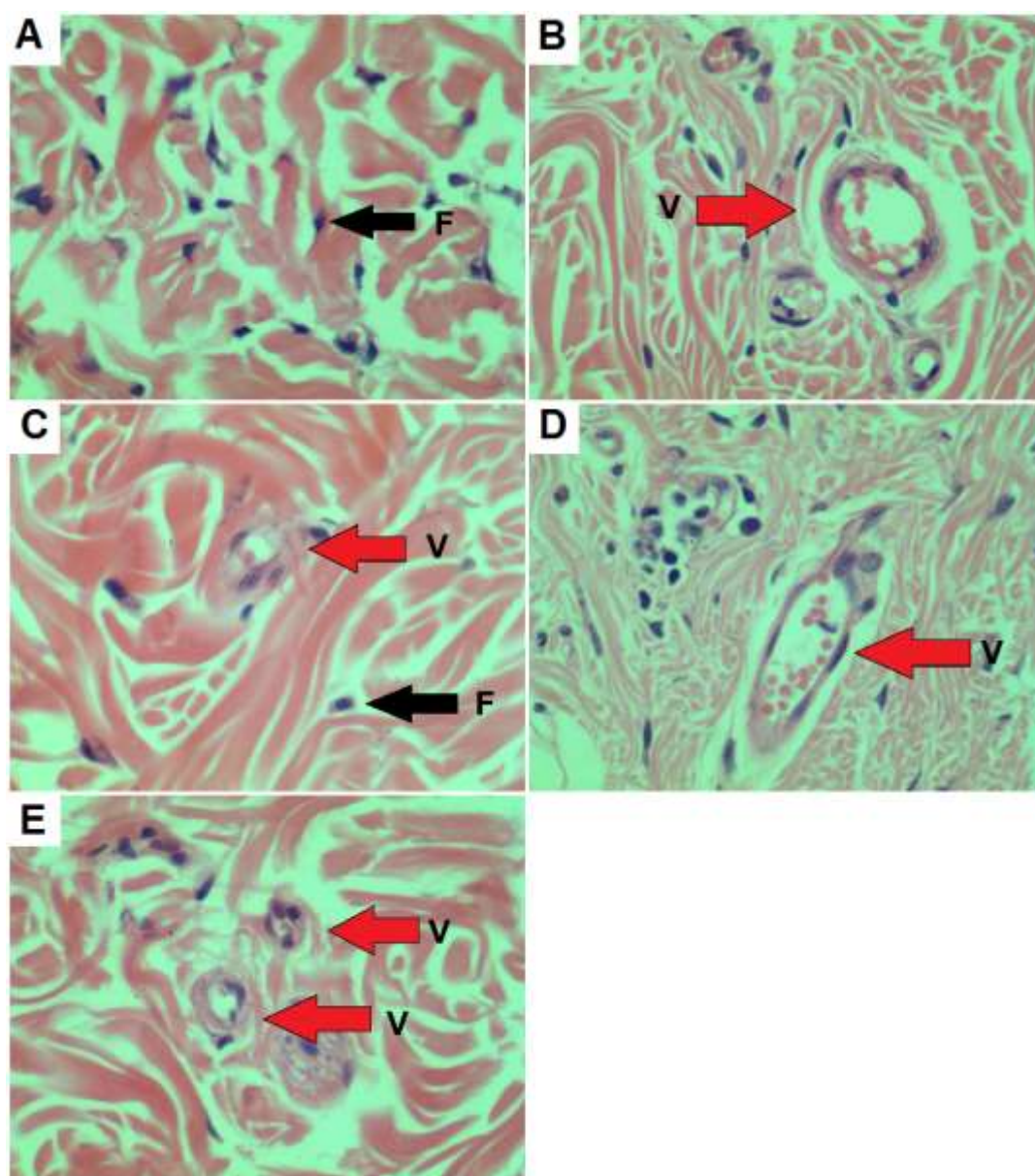


Figura 6: Imagens histológicas da pele (aumento **400X**, coloração por Hematoxilina e Eosina) dos diferentes grupos indicados como: CTL (A); NT (B); DIC (C); L1J (D) e

L3J (E). Indicação para fibroblastos (seta preta) e da presença de vaso sanguíneo (seta vermelha) no local da cicatriz.

Na figura 5, é possível observar as alterações no local da cicatriz, visíveis no grupo NT (C e D). No grupo DIC é ainda possível identificar o local da cicatriz (E e F), enquanto que no grupo L1J (G e H) e no grupo L3J (I e J) a cicatriz apresenta-se mais discreta praticamente sem alteração quando comparamos ao padrão histológico adjacente. É possível observar diferença na coloração de colágeno que estão com tonalidade mais vermelho-alaranjado, quando utilizamos a luz polarizada, nos grupos NT (D) e DIC (F).

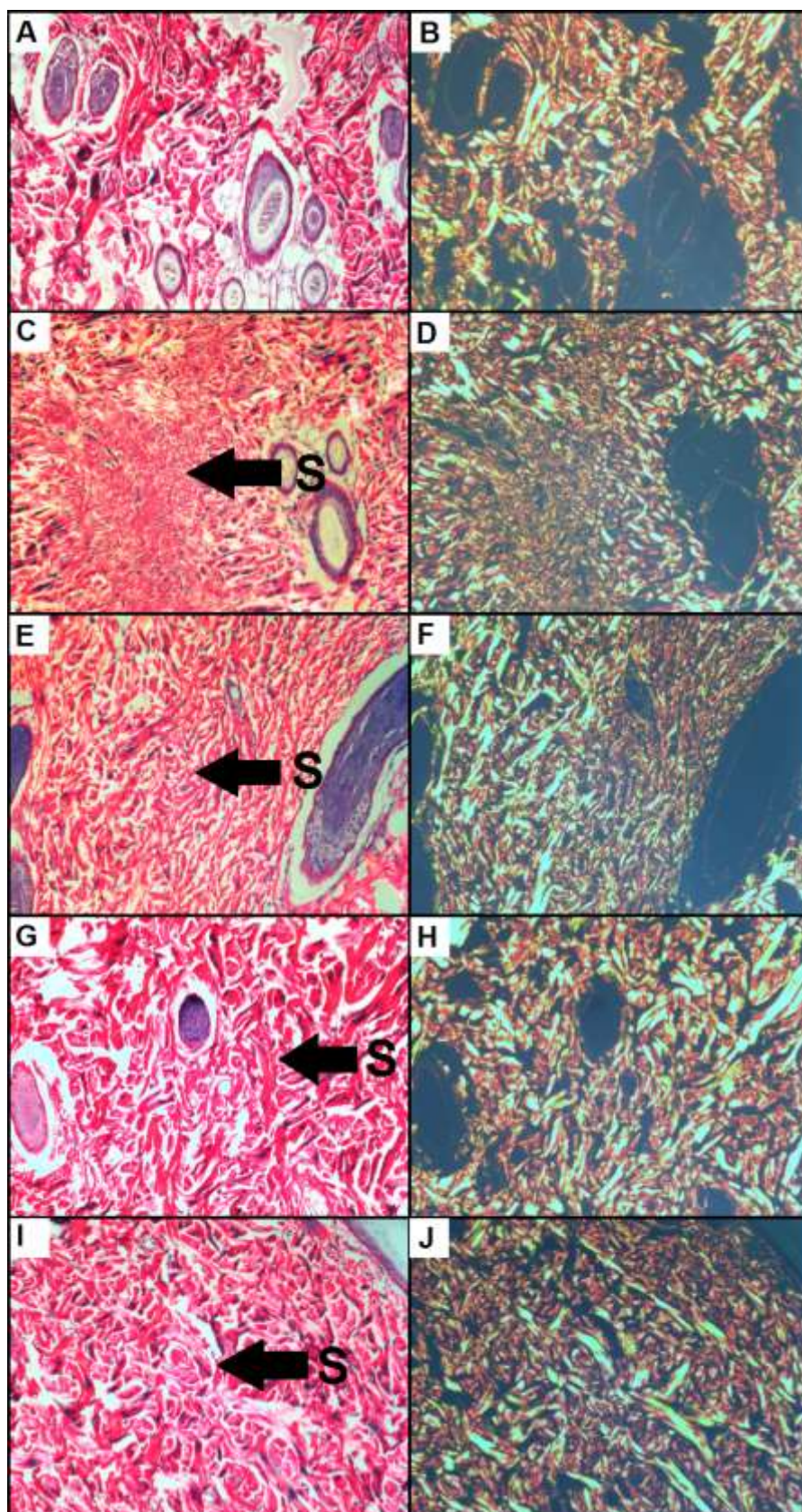
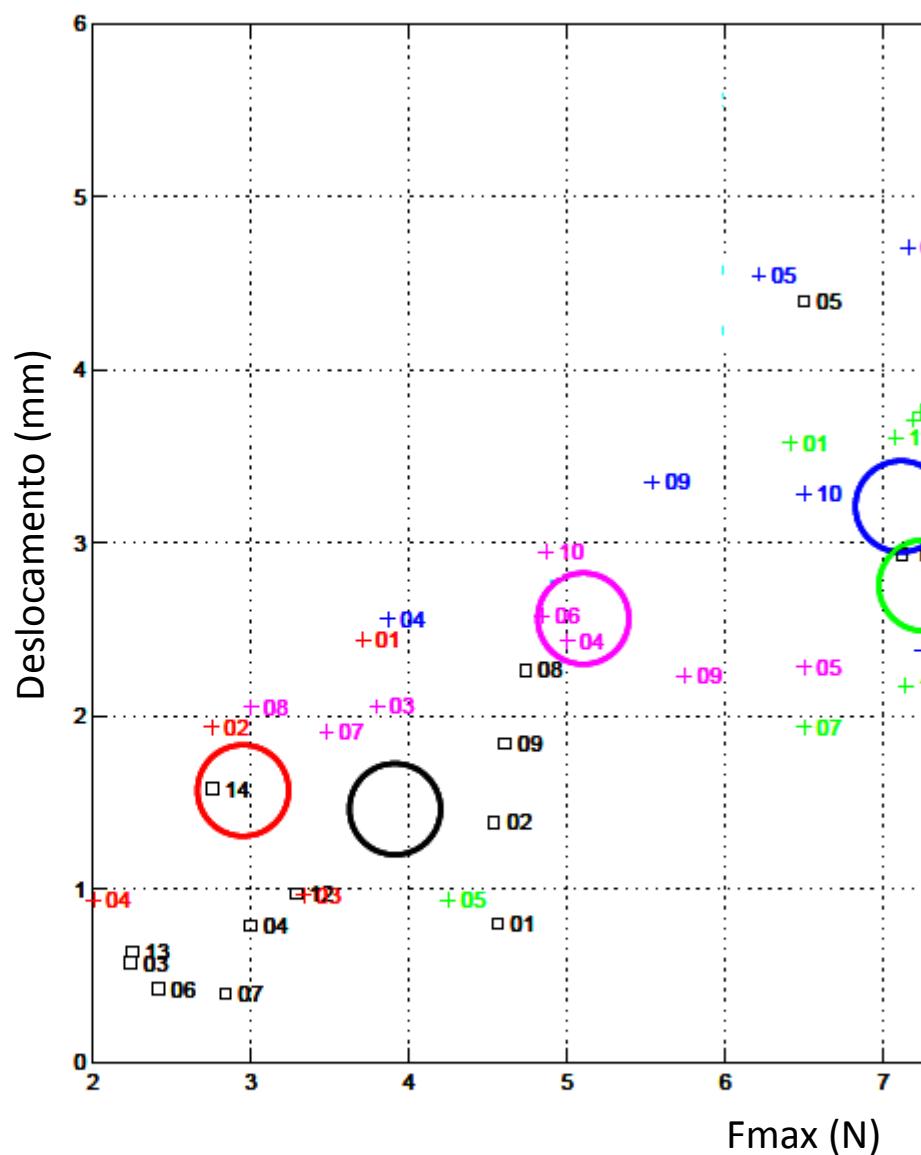


Figura 7: Imagens histológicas da pele (aumento de 100X coloração por Picrosirius red sem polarização A, C, E, G, I e por Picrosirius red com polarização da

luz B, D, F, H, J). Nos diferentes grupos indicados como: CTL (A, B); NT (C, D); DIC (E, F); L1J (G, H) e L3J (I, J). Indicação do local da cicatriz (seta preta).

O Gráfico 2 mostra a relação entre os valores da força máxima de tração (F_{max}) em Newtons (N) e o seu respectivo deslocamento no momento da ruptura do tecido em milímetros (mm), durante o ensaio de tração. Foi observado um deslocamento dos grupos NT, DIC e L3J para baixo do grupo controle. O grupo L1J apresentou características de força máxima de tração (F_{max}) e de deslocamento próximos ao grupo saudável (CTL).



5- DISCUSSÃO

A pele pode sofrer contínuos processos lesivos, levando à formação de tecido cicatricial, de característica fibrosa, alterando assim suas propriedades específicas (WOOD, 2014). Esta perda da integridade da pele presentes nas feridas e cicatrizes deve ser restaurada imediatamente, ou o mais rapidamente possível, a fim de restabelecer sua homeostase (CHOUCAIR & PHILLIPS *et al*, 1997; LI *et al*, 2005; GREAVES *et al*, 2013). Assim, inicia-se um processo cicatricial, no local da lesão. Este processo fisiológico complexo, que visa a restauração da integridade da pele, geralmente está dividido em hemostasia, fase inflamatória, formação de tecido de granulação, e re-epitelização (fases migratórias), terminando no remodelamento tecidual (CHOUCAIR & PHILLIPS *et al*, 1997; ENOCH & LEAPER *et al*, 2005; ROLIN *et al*, 2014).

A fase inflamatória é essencial para o direcionamento do reparo, ocorrendo uma variedade de sinalizações intercelulares que promovem o recrutamento de diferentes tipos celulares, como granulócitos e macrófagos para o local da ferida, iniciando a formação do tecido cicatricial (SCHREML *et al*, 2010; GANTWERKER *et al*, 2011). Assim, terapias que atuem na modulação do processo inflamatório tem especial importância, levando a formação de um tecido com características próximas ao original.

O Diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório não esteroideal bastante utilizado em processo inflamatório agudo, com conhecida ação analgésica. Porém, alguns trabalhos demonstram que o diclofenaco de sódio, quando utilizado no tratamento de feridas, apresenta melhora do quadro inflamatório nos primeiros dias de tratamento. Contudo, após 3 semanas de tratamento o tecido cicatricial pode sofrer alterações mecânicas tornando-se mais frágil, aumentando as chances de ruptura (QUIRINIA & VIIDIK *et al*, 1997).

Em relação às terapias não farmacológicas, o laser de baixa potência já foi demonstrado como uma terapia eficaz no reparo da pele (CARVALHO *et al*, 2006;

MEDRADO *et al*, 2008; CORR *et al*, 2009; CURY *et al*, 2013). Porém, a relação entre as alterações histológicas com a análise funcional pela determinação das propriedades biomecânicas ainda não foi totalmente estudada.

Apresentamos neste trabalho um modelo de lesão de pele induzido por bisturi, um modelo experimental que se assemelha às incisões realizadas em procedimentos cirúrgicos. Como terapias para promoção da cicatrização, utilizamos a terapia farmacológica pelo uso do diclofenaco de sódio tópico e a terapia com laser de baixa potência. Utilizamos parâmetros dosimétricos pré estabelecidos que demonstraram, em estudo prévio, a ação do laser na modulação do processo inflamatório em tendões, resultando em melhora das propriedades biomecânicas (MARCOS *et al*, 2014).

Os resultados obtidos mostram a redução de determinadas propriedades mecânicas da pele (força máxima de ruptura e deslocamento) nos grupos não tratado (NT) e farmacológico (DIC) e melhora destas propriedades nos grupos irradiados (L1J) e (L3J), em relação ao grupo NT.

Comparando a densidade de energia do grupo L1J com o grupo L3J, observamos que esta é pouco mais que 03 vezes maior no grupo L3J. Paralelamente observamos alterações nos testes de propriedades mecânicas quando comparamos os dois grupos. Tais fatos sugerem que a irradiação em menor densidade no grupo L1J estimulou a formação de uma cicatriz de melhor qualidade biomecânica do que a do grupo L3J onde o processo parece ter sofrido algum tipo de inibição. Associado a tais resultados nota-se na histologia que o grupo L1J apresenta fibras de colagens mais bem organizadas do que no grupo L3J.

A terapia com diclofenaco de sódio ou com laser de baixa potência, foi iniciada imediatamente após a indução da lesão e foi mantido o tratamento diário até o 7º dia. Levando-se em consideração que a fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão e permanecer por alguns dias, o tratamento utilizado aqui provavelmente interferiu na fase inflamatória da lesão, atuando tanto como estimulador ou inibidor do processo inflamatório, influenciando o reparo devido a capacidade da radiação do laser de baixa potência reduzir os níveis de importantes mediadores inflamatórios (MARCOS, *et al*, 2012,2014).

Os tecidos lesionados apresentam uma redução significativa de suas propriedades mecânicas, realçando ainda mais a necessidade de ampliar a pesquisa

dos tratamentos destes tipos de lesões, visando a restauração do comportamento biomecânico da pele no local da cicatriz. Neste sentido, a avaliação mais frequente das propriedades biomecânicas seria fundamental para compreender seu comportamento frente aos processos lesivos ou mesmo a outros eventos, como no envelhecimento ou visando avaliar a eficácia de diferentes tratamentos e terapias (FUNG *et al*, 1999; HOLLANDER *et al*, 2003). Desta forma, a determinação da força máxima de ruptura nos fornece meios para a compreensão e avaliação da qualidade da ferida, bem como sua evolução após intervenções cirúrgicas (CORR *et al*, 2009).

Nos resultados foi demonstrado que apenas o grupo L1J não apresentou redução na força de tração no momento de ruptura quando comparado ao grupo controle (CTL).

O grupo L3J, apesar de apresentar redução da força de tração no momento da ruptura, seu valor foi superior ao grupo não tratado (NT).

O grupo tratado com diclofenaco tópico (DIC) apresentou importante redução na força de tração no momento de ruptura, quando comparado ao grupo não tratado (NT).

O valor do deslocamento máximo no momento da ruptura demonstra a capacidade de deformação de um material frente a uma força aplicada, que em nosso caso foi a própria força de tração aplicada pela máquina a cada carregamento.

Nossos resultados mostraram que todos os grupos lesionados apresentaram redução da capacidade de deformação. Mesmo o grupo L1J apresentou redução, porém menor que nos outros grupos.

A relação entre a força máxima de tração e o deslocamento do tecido nos fornece pontos no eixo X e Y do gráfico, permitindo determinar a angulação “ α ” apresentada pelos grupos. Assim, quanto maior o valor de α , maior a rigidez do tecido.

Em nosso trabalho foi possível verificar um aumento deste ângulo no grupo DIC sugerindo que este grupo, além de apresentar redução nas propriedades mecânicas, como força de tração e deslocamento, também apresenta maior rigidez secante (K_s) e portanto, maior facilidade à ruptura.

A determinação do tipo de colágeno através da observação de lâminas histológicas corada por picrosirius red através de luz polarizada é bastante conhecida. Nos estágios iniciais da cicatrização do tecido, as fibras de colágeno são mais delicadas e menos rígidas, mostrando uma disposição solta e uma birrefringência com colocação verde-amarelo, indicando a presença de colágeno tipo III. Nas fases posteriores do processo de reparo as fibras apresentam um padrão de organização mais compacta e rígida, neste caso a coloração observada é a cor vermelho-rosa-laranja, indicando a presença de colágeno tipo I (CARVALHO *et al*, 2006; MEDRADO *et al*, 2008).

Na coloração por picrosirius red, foi possível observar que o grupo NT (figura 7C) apresentou uma desorganização da matriz extracelular e alteração na intensidade da presença de colágeno (figura 7D) no local da cicatriz.

Com a coloração de hematoxilina - eosina (HE) observa-se a formação de vasos próximos ao local da lesão, no grupo NT, mas em pequena quantidade (figura 6B).

Ainda com a coloração por HE, mas no grupo tratado com Diclofenaco de Sódio (DIC) foi possível observar a presença de vasos próximos ao local da lesão (figura 6C), já com a coloração por picrocirius red nota-se a disposição frouxa das fibras de colágeno. (figura 7E). A predominância da coloração vermelho-rosa-laranja indica a presença de colágeno tipo 1 (figura 7F). Provavelmente estas alterações justifiquem a baixa força de tração apresentada pelo grupo DIC (Gráfico 2).

Com uso da coloração HE nota-se que os grupos irradiados L1J e L3J apresentaram maior quantidade de vasos sanguíneos próximos ao local da lesão (figura 6D e 6E), diferente do grupo NT onde a presença dos vasos estava nas periferias do tecido lesionado (cicatriz).

Na coloração por picrocirius red tanto o grupo L1J (figura 7G e 7H) quanto o grupo L3J (figura 7I e 7J) apresentaram distribuição de colágeno e intensidade da coloração pela luz polarizada semelhante ao grupo saudável CTL (figura 7A e 7B).

O grupo DIC apresentou uma intensidade de coloração de colágeno diferente do grupo CTL e provavelmente esta alteração pode estar relacionada com a rigidez do tecido. Porém seria necessária uma investigação bioquímica da proporção de

colágenos I e III para confirmar quantitativamente estas presenças e esclarecer este cenário.

A terapia com laser de baixa potência tem demonstrado ser capaz de modular o processo de cicatrização de feridas, estimulando a angiogênese, modulando a inflamação, estimulando o metabolismo celular e a proliferação celular (MEDRADO *et al*, 2008; CURY *et al*, 2013). Esta modulação também estaria relacionada à ativação de queratinócitos e síntese de colágeno, promovendo não só a resolução do processo inflamatório, mas também o reparo tecidual, contribuindo para a melhora na qualidade histológica do tecido (SILVA *et al*, 2013).

É conhecido que o laser promove uma antecipação da resposta inflamatória acelerando o processo de reparo na cicatriz (PEREIRA *et al*, 2010), por estimular a angiogênese próximo do local da lesão e por aumentar a deposição de colágeno, esta alteração na matriz do tecido cicatricial reflete na alteração do comportamento biomecânico (MELO *et al*, 2011; CORR *et al*, 2009).

Durante o processo de reparo, são formadas ligações cruzadas de colágeno responsáveis pelo endurecimento dessas fibras e alteração das propriedades mecânicas do tecido. Estas ligações cruzadas sofrem alterações com o passar do tempo e aumentam com a recuperação do tecido (FRANK *et al*, 1995; PUXKANDL *et al*, 2002; CORR *et al*, 2009).

A terapia com laser de baixa potência além de estimular a deposição de colágeno, e melhorou o padrão organizacional destas fibras. Estes resultados podem estar relacionados a proporção de colágeno tipo I e III presentes no tecido e a não realização de dosagem bioquímica é uma das limitações de nosso trabalho.

A realização de quantificação bioquímica dos tipos de colágeno, tipo I e III talvez explicasse a maior rigidez no grupo DIC, bem como a melhora na força de tração nos grupos L1J e L3J.

É conhecido que durante a fase de reparo, inicialmente o colágeno III é sintetizado e após algum tempo uma parte pode ser direcionada para colágeno tipo I (MEDRADO *et al*, 2008).

Desta forma, além da necessidade de quantificação do colágeno, também se faz relevante a investigação do processo de reparo em tempos maiores, por exemplo,

60 e 90 dias após a indução da lesão. Neste caso teríamos um cenário diferente para as propriedades biomecânicas e padrão histológico, principalmente pela alteração das proporção entre colágeno tipo III e tipo I, complementando ainda mais os resultados sobre este tema.

Embora a laserterapia apresente um histórico de uso com bons resultados clínicos, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado (PUGLIESE *et al*, 2003; RICH & WHITTAKER *et al*, 2005). Já é conhecido seu efeito anti-inflamatório, que direciona para o reparo tecidual, promovendo melhora nas propriedades mecânicas de determinados tecidos (CARVALHO *et al*, 2006; MELO *et al*, 2011; MARCOS *et al*, 2014).

A maioria dos trabalhos clínicos mostra a eficácia da laserterapia no reparo de lesões na pele, porém poucos investigam as alterações histológicas relacionadas a modulação dos elementos da matriz e à organização de colágeno e este número ainda é menor quando se pensa em comparar as alterações histológicas junto à avaliação das propriedades mecânicas do tecido (CARVALHO *et al*, 2006; RIBEIRO *et al*, 2009).

Portanto são necessários mais estudos que investiguem a correlação entre as propriedades mecânicas de um tecido com a composição e organização das estruturas da pele.

6- CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que após 28 dias da indução da lesão cortante por bisturi na pele de ratos, o grupo não tratado apresentou redução das propriedades mecânicas, como: força de tração no instante da ruptura e também redução da capacidade de deformação do tecido (indicado pela redução do deslocamento máximo).

O tratamento com diclofenaco de sódio tópico não apresentou melhora das propriedades mecânicas do tecido cicatricial.

A laserterapia na energia de 1J apresentou melhora na força de tração e na capacidade de deformação, comparado ao grupo não tratado, com resultados gráficos muito próximos ao grupo controle tanto no parâmetro de deslocamento quanto na força de ruptura máxima (F_{max}).

Histologicamente nota-se que a desorganização das fibras de colágeno é maior no grupo não tratado (NT) e no grupo diclofenaco (DIC).

Contudo, outros testes biomecânicos para determinação da elasticidade, bem como a análise da quantificação e direcionamento das fibras de colágeno são necessários para o melhor entendimento deste mecanismo de reparo tecidual, e possível correlação com a orientação das fibras e o tipo de colágeno em predominância (tipo I ou tipo III) em cada fase do processo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

ABREU, AC; SOUSA AL; FÔNSECA, CLG; NUNES, JT. Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser. Scientia Medica (Porto Alegre) 2011; v21, n3, p. 96-100.

AVCI P, GUPTA A, SADASIVAM M, VECCHIO D, PAM Z, PAM N, HAMBLIN MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. Semin Cutan Med Surg. 2013 Mar;32(1):41-52.

AZEVEDO, L.S., Laser de Helio-Neonio no processo de cicatrização de feridas em ratos. Disponível em :<www.ufpe.br/fisioterapia/lase.html-14k>.

BLANES, L., Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J.C.C. (Ed). Cirurgia Vascular: guia ilustrado. São Paulo: (s.n); p.23;2004 Disponível em:<<http://www.baptista.com>>.

CARVALHO, P.T.C., MAZZER, N., SIQUEIRA, J.F.R., FERREIRA, J.V.L., SILVA, I.S., Analise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiacao de laser HeNe. Fisioterapia Brasil, v. 4, n. 4, p. 253-258, jul./ago. 2003.

CARVALHO PTC, MAZZER N, REIS FA, BELCHIOR ACG, SILVA IS. Analysis of the low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. Acta Cir Bras. 2006;21(3):177- 83.

CARVALHO, RLDP; ALCÂNTARA, PS; KAMAMOTO, F; CRESSONI MDC ; CASAROTTO, RA. Effects of Low-Level Laser Therapy on Pain and Scar Formation After Inguinal Herniation Surgery: A Randomized Controlled Single-Blind Study. Photomedicine and Laser Surgery, v. 28, p. 417-422, 2010.

CHOUCAIR MM, PHILLIPS TJ. What is new in clinical research in wound healing. *Dermatol Clin*. 1997 Jan;15(1):45-58.

CORR DT, GALLANT BEHM CL, SHRIVE NG, HART DA, Biomechanical behavior of scar tissue and uninjured skin in a porcine model. *Wound Repair Regen*. 2009 Mar-Apr;17(2):250-9.

CURY V, MORETTI AI, ASSIS L, BOSSINI P, CRUSCA JDE S, NETO CB, FANGEL R, DE SOUZA HP, HAMBLIN MR, PARIZOTTO NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Aug 5;125:164-70. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004. Epub 2013 Jun 19.

DAWOOD MS, SALMAN SD. Low-level diode laser accelerates wound healing. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):941-5.

DA SILVA A, LEAL-JUNIOR EC, ALVES AC, RAMBO CS, DOS SANTOS SA, VIEIRA RP, DE CARVALHO PDE T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *J Cosmet Laser Ther*. 2013 Aug;15(4):210-6.

DE MELO RAMBO CS, SILVA JA JR, SERRA AJ, LIGEIRO AP, DE PAULA VIEIRA R, ALBERTINI R, LEAL-JUNIOR EC, DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO P. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(5):1723-33.

ENOCH S, LEAPER DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 2005 – Elsevier

FIÓRIO FB¹, ALBERTINI R, LEAL-JUNIOR EC, DE CARVALHO PDE T. Effect of low-level laser therapy on types I, III collagen, and inflammatory cells in rats with induced third - degree burns. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan; 29(1):313-9.

FRANK C, MCDONALD D, WILSON J, EYRE D, SHRIVE N. Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res* 1995; 13: 157–65.

FUKUDA TY¹, TANJI MM, SILVA SR, SATO MN, PLAPLER H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013 Sep; 28(5):1305-13.

FUNG LC, MINGIN GC, MASSICOTTE M, FELSEN D, POPPAS DP. Effects of temperature on tissue thermal injury and wound strength after photothermal wound closure. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 285–90.

GANTWERKER EA, HOM DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011 Aug;19(3):441-53. doi: 10.1016/j.fsc.2011.06.009.

GARCIA Y¹, WILKINS B, COLLIGHAN RJ, GRIFFIN M, PANDIT A. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. Biomaterials. 2008 Mar;29(7):857-68.

GILLITZER, R., GOEBELER, M., Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 69:513-521; 2001.

GRAY, F.R.H., *Anatomia*. 29 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap. 14 , p. 891-907.

GREAVES NS, ASHCROFT KJ, BAGUNEID M, BAYAT A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute

wound healing. *Journal of Dermatological Science*. Volume 72, Issue 3, December 2013, Pages 206–217.

GUYTON, A.C., HALL, J.E., *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

HOLLANDER DA, ERLI HJ, THEISEN A, FALK S, KRECK T, MULLER S. Standardized qualitative evaluation of scar tissue properties in an animal wound healing model. *Wound Repair Regen* 2003; 11: 150–7.

HOLM-PEDERSEN P, VIIDIK A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1972;6(1):24-35.

JØRGENSEN PH, OXLUND H. Growth hormone increases the biomechanical strength and collagen deposition rate during the early phase of skin wound healing. *Wound Repair Regen*. 1996 Jan-Mar;4(1):40-7.

KHAVKIN J, ELLIS DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011 May;19(2):229-34. doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003.

KHOO NK, SHOKRGOZAR MA, KASHANI IR, AMANZADEH A, MOSTAFAVI E, SANATI H, HABIBI L, TALEBI S, ABOUZARIPOUR M, AKRAMI SM. In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014 Apr;6(2):113-8.

KJAER, M.; LANGBERG, H.; HEINEMEIER, K.; BAYER, M. L.; HANSEN, M.; HOLM, L.; DOESSING, S.; KONGSGAARD, M.; KROGSGAARD, M. R.; MAGNUSSON, S. P. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, v. 19, p. 500-510, 2009.

KRANKE P. HBTO for chronic wounds. Systematic review The Cochrane library. V.19 , p.28-29 Issue 4, 2012.

LI W, DASGEB B, PHILLIPS T, LI Y, CHEN M, GARNER W, WOODLEY DT. Wound-healing perspectives. *Dermatol Clin*. 2005 Apr;23(2):181-92.

LIMA AA¹, SPÍNOLA LG, BACCAN G, CORREIA K, OLIVA M, VASCONCELOS JF, SOARES MB, REIS SR, MEDRADO AP. Evaluation of corticosterone and IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α expression after 670-nm laserphotobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar; 29(2):709-15.

LINS, R.D.A.U. et al , Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potencia no processo de reparo. *An Bras Dermatol*. V. 85 , n. 6 , p. 849-855 , 2010.

MARCOS RL, LEAL-JUNIOR EC, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUADJ R, WANG X, DEMEURIE F, MAGDALOU J, DE CARVALHO MH, LOPES-MARTINS RÁ. Low-level laser therapy in collagensase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop res*. 2012 Dec;30(12):1945-51.

MARCOS RL, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUADJ R, MAGDALOU J, LOPES-MARTINS RÁ. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Jan;29:272-85.

MEDRADO, A.P., SOARES, A.P., SANTOS, E.T., REIS, S.R., ANDRADE, Z.A., Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobilo B*. 18, 92(3): 144-152; 2008.

MELO VA, ANJOS DC, ALBUQUERQUE JÚNIOR R, MELO DB, CARVALHO FU. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2011 Apr;26(2):129-34

MESTER, E., MESTER, A., MESTER, E., The biomedical effects of laser aplication. *Laser Surg Med*. 5: 31-39, 1985.

MESTER A. Laser biostimulation. Photomed Laser Surg. 2013 Jun; 31(6):237-9.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M., Patologia: processos gerais. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

NASCIMENTO, P.M., Efeito da variacao da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirurgicas em dorso de ratos: estudo histologico. 2001. Dissertacao (Mestrado em Engenharia Biomedica) -, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraiba , São Jose dos Campos.

NEIBURGER EJ. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: a preliminary study. Gen Dent. 1997 Mar-Apr;45(2):166-70.

ORGILL DP, BAYER LR, Update on negative-pressure wound therapy. Plast Reconstr Surg. 2011 ; 127 (Suppl 1): 105S-15S.

OXLUND H, FOGDESTAM I, VIIDIK A. The influence of cortisol on wound healing of the skin and distant connective tissue response. Surg Gynecol Obstet. 1979 Jun;148(6):876-80.

PEREIRA MCMC, PINHO CB, MEDRADO ARP, ANDRADE ZA, REIS SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. J Photochem Photobiol B. 2010;98(3):188-92.

POGREL MA, CHEN JW, ZHANG K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. Lasers Surg Med. 1997; 20(4):426–432.

PUGLIESE, L.S., MEDRADO, A.P., REIS, S.R.A., ANDRADE, Z.A., The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen elastic fibers. Pesqui Odontol Bras. V. 17, n. 14, p.307-313; 2003.

PUXKANDL R, ZIZAK I, PARIS O, KECKES J, TESCH W, BERNSTORFF S, PURSLOW P, FRATZL P. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357: 191–7.

QUIRINIA A, VIIDIK A. Diclofenac and indomethacin influence the healing of normal and ischaemic incisional wounds in skin. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997 Sep;31(3):213-9.

RESENDE, M.A.; PEREIRA, L.S.M.; CASTRO, M.S.A., Proposta de um modelo teorico de intervencao fisioterapeutica no controle da dor e inflamacao. *Fisioterapia Brasil*, v. 6, n. 5, p. 368-371, set. /out. 2005.

RIBEIRO MA, ALBUQUERQUE RL, RAMALHO LM, BONJARDIM LR, DA CUNHA SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblastic and lymphoid cells during wound healing in rats submitted to laser photobiomodulation at 660nm. *Photomed Laser Surg*. 2009;27:49-55.

RICH L, WHITTAKER P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*. 2005;22:97-104.

ROCHA JUNIOR, A.M., Low-level laser therapy and wound healing in humans. *J Vasc Bras*. V. 6, n.3, p. 258-266, 2007.

ROLIN GL, BINDA D, TISSOT M, VIENNET C, SAAS P, MURET P, HUMBERT P. In vitro study of the impact of mechanical tension on the dermal fibroblast phenotype in the context of skin wound healing. *J Biomech*. 2014 Sep 19. pii: S0021-9290(14)00396-0

SAMPAIO, S.A.P, RIVITTI, E.A., *Dermatologia*. 2 ed. São Paulo: Artes Medicas, 2001. cap. 1 , p. 6-35.

SCHREML S, SZEIMIES RM, PRANTL L, LANDTHALER M, BABILAS P. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* (PRINT). 2010 Nov;63(5):866-81.

SILVA EB, MANISCALCO CL, ESPER GVZ, GUERRA RR, KERPPERS II. Analises macro e microscopicas de enxertos cutaneos por semeadura apos laserterapia de baixa intensidade . *Rev Col Bras Cir*. Disponivel em URL: <http://www.scielo.br/rcbc> [periodico na internet] 2013; 40(1).

VAN BREUGEL HH, BÄR P. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med*. 1992;12(5):528–537.

VILELA, A.L.M., Sistema Tegumentar: estrutura do tegumento pele. Disponivel em: <<http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>>.

YIN Z, CHEN X, ZHU T, HU JJ et al. The effect of decellularized matrices on human tendon sten/progenitor cell differentiation and tendon repair. Acta Biomater. 2013 Dec;9(12):9317-29.

YOU C, WANG X, ZHENG Y, HAN C. Three types of dermal grafts in rats: the importance of mechanical property and structural design. Biomed Eng Online. 2013 Dec 4;12:125.

WANG X, YOU C, HU X, et al. The roles of knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. Acta Biomater. 2013 Aug;9(8):7822-32.

WOOD FM. Skin regeneration: The complexities of translation into clinical practise. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Available online 29 October 2014.

Lasers in Medical Science

EFFECT OF LOW LEVEL LASER (830NM) IN THE HEALING PROCESS IN RAT SKIN. BIOMECHANICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS.

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	EFFECT OF LOW LEVEL LASER (830NM) IN THE HEALING PROCESS IN RAT SKIN. BIOMECHANICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS.
Article Type:	Original Article
Keywords:	Scar, Healing, LLLT, Collagen, Mechanical Properties
Corresponding Author:	Rodrigo Labat Marcos, PhD Universidade Nove de Julho São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Nove de Julho
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luiz Gustavo Balaguer-Cruz
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luiz Gustavo Balaguer-Cruz Rodrigo Lopes-Martins Romildo Torres-Silva Ernesto Cesar Leal-Junior Rodney Pallotta Paulo de Tarso De Carvalho Lucio Frigo Rachid Rahouadj Gilles Arnold Rodrigo Labat Marcos, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The skin is a coating tissue which undergoes permanent environmental action, often in aggressive forms, causing damage to this tissue. Generally in the repair process structural changes occur which progress to the development of a scar. In this case the tissue may present morphological changes that interfere with its mechanical properties and this repair process produces a tissue with different properties than of the original tissue. Therefore, the use of therapies that favor this repair is important to seek a better scar quality. Low-level laser therapy appears as a resource used in the modulation of the inflammatory process helping the skin repair process. The objective of this study was evaluate the action of low level laser (830nm) in tissue repair after induction of skin injury, analyzing the biomechanical behaviour and histological changes of skin, 28 days after the harmful process: Male Wistar rats between 150g to 200g, 3 months old were used. The animals were anesthetized with association of xylazine hydrochloride and ketamine (90mg / kg and 10mg / kg, respectively, intraperitoneal injection). Once anesthetized, 2 lesions were performed using a surgical scalpel at the dorsal of the animal. The animals were divided into 5 groups of 7 animals: control (CTL), untreated scar (NT), scar + anti-inflammatory (DIC), scar + 1J laser (L3J) and scar + 3J laser (L3J). The pharmacological treatment and laser therapy were performed immediately after lesion induction and maintained daily irradiation until day 7. After 28 days, the

animals were euthanized with an overdose of the same anesthetic and the tissue was immediately removed for histological analysis and traction trials. Results: Both the NT and group showed a reduction of mechanical properties and alterations in histology analysis. L3J groups showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. We conclude that laser therapy improves certain mechanical properties of skin in this lesion model. However, more studies should be conducted to understand the proportion and organization of collagen fibers or even the study of repair times superior to those used in this study.

Abstract

The skin is a coating tissue which undergoes permanent environmental action, often in aggressive forms, causing damage to this tissue. Generally in the repair process structural changes occur which progress to the development of a scar. In this case the tissue may present morphological changes that interfere with its mechanical properties and this repair process produces a tissue with different properties than of the original tissue. Therefore, the use of therapies that favor this repair is important to seek a better scar quality. Low-level laser therapy appears as a resource used in the modulation of the inflammatory process helping the skin repair process. The objective of this study was evaluate the action of low level laser (830nm) in tissue repair after induction of skin injury, analyzing the biomechanical behaviour and histological changes of skin, 28 days after the harmful process. Male Wistar rats between 150g to 200g, 3 months old were used. The animals were anesthetized with association of xylazine hydrochloride and ketamine (90mg / kg and 10mg / kg, respectively, intraperitoneal injection). Once anesthetized, 2 lesions were performed using a surgical scalpel at the dorsal of the animal. The animals were divided into 5 groups of 7 animals: control (CTL), untreated scar (NT), scar + anti-inflammatory (DIC), scar + 1J laser (L3J) and scar + 3J laser (L3J). The pharmacological treatment and laser therapy were performed immediately after lesion induction and maintained daily irradiation until day 7. After 28 days, the animals were euthanized with an overdose of the same anesthetic and the tissue was immediately removed for histological analysis and traction trials. Results: Both the NT and group showed a reduction of mechanical properties and alterations in histology analysis. L3J groups showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. We conclude that laser therapy improves certain mechanical properties of skin in this lesion model. However, more studies should be conducted to understand the proportion and organization of collagen fibers or even the study of repair times superior to those used in this study.

1. Introduction

The skin is the largest organ in the body, representing more than 15% of body weight of the individual and because of its large size, their topographical features and the fact that it is a coating tissue, is subject to aggressions during all stages of human life (BLANES 2004).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In Europe, 750 million Euros are spent a year in treating wounds. In the United States this figure reaches 600 million dollars a year (EWMA / WUWHS). These factors have mobilized the pharmaceutical and cosmetics industry to develop specific products suitable for every type of skin lesion (BUFALARI, 1996; BIONDO-Simões, 2005). These facts justify the need for even more comprehensive studies in this area in order to minimize the social and economic stigma that the problem of wounds cause today in our country.

The skin is a complex organ with many structures when affected during a harmful process, can lose its specific characteristics and properties by the formation of scar tissue. (MODOLIN and BEVILACQUA, 1985; CANDIDO, 2001). Thus, the tissue repair process should be considered a separate event, with objective to maintain the anatomical structure and function of the affected region. This phenomenon involves many factors and the imbalance or absence of compounds (inflammatory mediators, the blood cells, extracellular matrix and parenchymal cells), especially those involved in collagen formation compromises the final result of healing. (Nascimento, 2001; Azevedo, 2004; BLANES, 2004).

In general, it is considered that tissue repair is due to histological changes by reducing inflammatory infiltrate, increasing granulation tissue, epithelization, increased fibroblast proliferation and collagen rich extracellular matrix synthesis plus neovascularization, which would contribute to a greater expression of collagen and elastic fibers during the healing process. (PUGLIESE et al, 2003; Carvalho et al, 2003; Rocha et al, 2006).

In recent years, numerous clinical and animal studies were performed, resulting that laser therapy is considered a therapeutic option in the healing process (Dawood et al, 2013; DA SILVA et al, 2013; MESTER, 2013; AIS et al, 2013 ; DE MELO RAMBO et al, 2014; Khoo et al, 2014).

Initially, the laser would still take part in the inflammatory phase, activating keratinocytes and synthesizing collagen promoting not only the resolution of the inflammatory process, but also tissue repair, helping to improve the quality of histological tissue (SILVA, EB, 2013). Recent studies have also shown a potential remedial effect of the laser, the increased expression of type I collagen and the reorganization of these fibers (Oliveira et al, 2009; Fiorio et al, 2014).

Some studies show evidence about what would be the laser action mechanism in the healing process. There is evidence that the laser can reduce the gene expression of several inflammatory mediators such as PGE2, IL1- β , TNF- α and increase the expression of other anti-inflammatory mediators such as IL-10 (Fukuda et al, 2013; Melo OF Rambo et al , 2014; LIMA AA et al, 2014).

However, literature regarding the low-level laser therapy in acceleration of wound healing is very controversial, since some of the studies show positive results, while another part shows little or no effect in this repair process. These differences may be related to different protocols used by the authors (Damante et al, 2008).

It is currently believed that the laser has modulating action on the inflammatory process being able to biostimulate and bioinhibit healing by determining various parameters such as irradiation wavelength, energy density, power density, number of laser applications, treatment time and the tissue to be treated. However, there is still no consensus on the exact dosimetry to be administered for each type of treatment or for each condition or process to be addressed (Lins, 2010; Abreu, 2011).

Considering the facts presented above, the importance of studies demonstrating the remedial effect of low power laser, and an understanding of its association with drug therapy considered traditional therapy, is a highly relevant factor for the health system. However few study addressing functional and biomechanical aspects of low power laser in the skin healing process.

2 OBJECTIVES

evaluate the action of low level laser (830nm) in tissue repair after induction of skin injury, analyzing the biomechanical behaviour and histological changes of skin, 28 days after the harmful process.

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Animals

35 male Wistar rats were used weighing between 150 and 200g (+/- 60 days). This experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Nove de Julho University under number (AN0045 / 2014).

3.2 scar Induction

The animals were anesthetized with a xylazine hydrochloride and ketamine association (90mg / kg and 10mg / kg, respectively, intraperitoneal injection). After anesthesia two 12mm longitudinal surgical incisions were performed in the central region on the animal's dorsal, using a surgical scalpel 15.

The animals were divided into 5 groups of 7 animals, as shown below in the experimental groups. The pharmacological therapy and laser therapy were performed immediately after induction of incisions and irradiation maintained daily until day 7. After 28 days, the animals were euthanized with the same anesthetic overdose and the

sample in the incision region was removed for histological and traction trials. Each sample measured 15 mm long and 5 mm wide.

3.3 Experimental Groups

The animals were divided into different groups as described below:

- Control Group (C): animals with intact skin.
- Group with lesion and untreated (NT): Animals with surgical incision by scalpel and without treatment, sacrificed after 28 days from cut induction.
- Group with lesion and treated with Diclofenac sodium (DIC): Animals with surgical incision by scalpel and treated with daily injections of Diclofenac Sodium (1 mg / kg IM). The first treatment was performed immediately after the induction in the animal's skin and maintained until the seventh day after the beginning of the lesion.
- Irradiated Group (L1): Animals with surgical incision by scalpel and treated with laser therapy at a wavelength of 830nm, 1J energy and power of 100mW.
- Irradiated Group (L3): Animals with surgical incision by scalpel and treated with laser therapy at a wavelength of 830nm, 3J energy and power of 100mW.

3.4 Application of Low Level Laser Therapy (LLLT)

After undergoing the induction scar model by cutting with metal scalpel, the animals in irradiated groups received treatment with low power laser, immediately after the lesion process. The irradiations were punctual (single point), by contact for 7 days.

<<Figure 1>>

3.5 mechanical properties of the skin

Animals in all groups were sacrificed 28 days after the beginning of treatment and the dorsal skin sample where the incision was made surgically with dimensions of 5mm in width and 10mm in length were removed for further analysis. Part of this material was used immediately after removal, in traction trials to evaluate their mechanical properties. The normal activity of skin is formed by a group of tensions applied to the tissue, divided into loading and unloading forces. Thus, in order to simulate the

conditions of actual tension of the skin a sequence of loading and unloading forces will be applied.

First the length, width and height of the sample will be measured. These values will be used to detail the size of the material and standardization of results. Each end of the skin was fixed in clips to each end of the flap of skin, in the mechanical testing machine (EMIC200). Several load and unloading forces tests will be realized until the time of rupture of the tissue, as shown in the figure below.

During the standardization of the traction test, a loading and unloading speed of 6 mm / min and 0.5 mm was added for each loading. The mechanical traction test was stopped automatically after the rupture of the tissue and the following parameters were analyzed:

Maximum Force - (Fmax)

Displacement - (Dmax)

Stiffness - (α)

3.6 Histological Preparation of samples

Skin samples underwent standard histological preparations, starting by fixation of the tissue in formaldehyde(10%) for 24 hours. Immediately after the skins were washed in running water and then dehydrated in graduated ethyl alcohol solutions (70%, 80%, 90% and 100%) 1h in each solution. After the skins were cleared in alcohol solution / xylene 1: 1 for 1 hour, then passed through 2 baths of pure xylene 1hour each. The skins were removed from the xylene and placed immediately in liquid paraffin (60 ° C) in an oven for 2 hours. Later the blocks were made to obtain the histological sections. The skins included in the paraffin blocks were cut lengthwise into sections of 5 μ m in thickness and transferred to histology slides which were deparaffinized and hydrated. 2 stains were used: 1st) hematoxylin and eosin, to enable the visualization of certain structures such as blood vessels, cells, and extracellular matrix, 2nd) picosirius red for collagen view.

3.7 Statistical Analysis

Data were presented as mean values with their standard deviations. Both were analyzed in absolute values as their variation in percentage, from the values obtained for the biomechanical analysis. For parametric data, we used ANOVA with post-hoc Tukey-Kramer. The level of significance was set at $p < 0.05$.

4 RESULTS

From the experiments performed, we can plot the following graphics and images shown below:

Figure 2 shows the histological sequence of diverse groups, healthy and injured, in the different treatments. It is possible to observe the presence of vessels (red arrow) and fibroblasts (black arrow) in epithelial tissue.

<<Figure 2>>

In Figure 3, you can see the changes on the site of the scar, visible in the NT group (C and D). The DIC group is still possible to identify the location of the scar (E and F) while on L1J Group (G and H) and in the L3J Group (I and J) the scar is more discreet. It is possible to observe a difference in staining of collagen when using polarized light, NT groups (D) and DIC (F).

<<Figure 3>>

The graph in Figure 4 shows the relationship between the values of the maximum traction force (F_{max}) in Newtons (N) and its offset in the time of rupture of the tissue in millimeters (mm), during the test of traction. It was observed an offset of NT groups, DIC and L3J down the control group. L1J group presented characteristics of maximum traction force (F_{max}) and offset next to the healthy Group (CTL).

<<Figure 4>>

5 DISCUSSION

The skin may suffer harmful processes continued, leading to the formation of a scar tissue, fibrous characteristic, thereby changing its specific properties (WOOD, 2014). This loss of skin integrity found in wounds and scars should be restored immediately in order to restore its homeostasis (CHOUCAIR PHILLIPS, 1997; Li et al., 2005; GREAVES et al, 2013). Thus begins a process that drives the scar site of injury to tissue repair. This complex physiological process that aims at the restoration of the integrity of the skin is usually divided in hemostasis, inflammatory, granulation tissue formation, epithelialization, re-finishing on tissue remodeling (CHOUCAIR PHILLIPS, 1997; ENOCH LEAPER, 2005; ROLIN et al, 2014).

The inflammatory phase is essential for targeting fix occurring a variety of intracellular signals that promote the recruitment of different cell types as granulocytes and macrophages to the site of the wound, initiating the formation of scar tissue (SCHREML et al, 2010; GANTWERKER, 2011).

Thus, therapies that act in the modulation of the inflammatory process would be especially important for auxiliary repair, leading to formation of a fabric with upcoming features of the original. Some studies showed that diclofenac sodium, when used in the treatment of wounds, presented inflammatory clinical improvement in the early days of treatment. However, after 3 weeks of treatment the scar tissue may suffer mechanical changes making it more fragile, increasing the chances of rupture (QUIRINIA VIIDIK, 1997).

In relation to non-pharmacological therapies, the low-power laser has been demonstrated as an effective therapy in the repair of skin (CARVALHO et al., 2006; JAMES et al., 2008; CORR et al., 2009; CURY, 2013). However the relationship between histological changes with the functional analysis for determining the biomechanical properties has not yet been fully studied.

We present in this paper a type of skin lesion induced by scalpel, an experimental model that resembles the sutures found in surgical procedures. As therapy for promoting this repair, we use the pharmacological therapy by diclofenac sodium and low power laser therapy. The parameter used for irradiation diode laser was 830nm, 100mW and 0, 028cm² of beam diameter, the energies of 1 and 3 Joules,. These values have been transported from previous work where laser action was observed on modulating the inflammatory process with improvement of mechanical properties (Marcos et al, 2014). We also present results that show the reduction of certain mechanical properties of the skin in the treated groups (NT) and pharmacological (DIC) and improvement of these properties in irradiated groups (L1J) and (L3J) in relation to the NT group.

Therapy with diclofenac sodium or low power laser, was initiated immediately after the induction of injury and was kept daily treatment until the day 7. taking into consideration the inflammatory phase initiated immediately after the injury and stay for a few days, the style used here probably interfered in the inflammatory phase of the injury serving as modulator or inhibit the inflammatory process influencing the repair by the ability of the laser to reduce important inflammatory mediators (Marcos, 2012 and 2014).

The fact that the injured tissue present a significant reduction of its mechanical properties tensile stresses the need to broaden the clinical treatments of these types of injuries in order to restore the biomechanical behavior of the skin at the site of the scar. In this sense, the evaluation of the properties would be fundamental to understand its behavior against harmful process or even of other events, such as in aging or even to know the effectiveness of different treatments and therapies (FUNG et al., 1999; HOLLANDER et al., 2003). Similarly, the determination of the maximum strength of breakage in provides a means for understanding and assessing the quality of the wound as well as its progression after surgical interventions (CORR et al, 2009)

In this work, it was possible to observe a reduction in the force of traction in all groups in which the injury was induced, except with L1J group.

The L3J group, although present reduction of tractive force at the moment of rupture, its value was higher than the untreated group (NT). Already the group treated with diclofenac topical (DIC) presented important reduction even when compared to the NT group.

The values of maximum separation at the time of rupture demonstrates the ability of deformation of a material to an applied force, which in our case was his own traction force applied by the machine to each shipment. Our results showed that all groups injured showed reduced ability of deformation. Even the reduction however, L1J group less significant than other groups.

The relationship between maximum tensile force and displacement of the fabric provides us with points in X and Y axis of the chart, and determines the angle presented by groups and the larger this value, the greater the stiffness of the fabric. In our study was possible to verify an increase from this angle in DIC group suggesting that this group, besides presenting reduction in mechanical properties such as tensile strength and displacement, also presents greater rigidity and easier to break.

The determination of type of collagen through observation of histological slides stained by picrosirius through polarized light is well known. In the early stages of healing of tissue, the collagen fibers are more delicate and less rigid, showing a loose arrangement and a birefringence with putting green-yellow, indicating the presence of collagen type III. On the other hand, in the later stages of the repair process the fibres

exhibit a pattern of more compact and rigid organization and in this case the colouration observed is the color red-pink-orange, indicating the presence of type I collagen (CARVALHO et al., 2006; JAMES et al., 2008).

Comparing these biomechanical data with histological figures, it was possible to observe that the NT group (Figure 3 c) presented a disorganization of extracellular matrix and collagen intensity change (Figure 3 d) at the site of the scar. It was still possible to observe the formation of blood vessels near the site of injury, but to a lesser extent (Figure 2B). In the group treated with Diclofenac (DIC) it was possible to observe the presence of vessels near the site of the lesion (Figure 3 c), but both the arrangement of collagen (figure 3E) as this intensity (figure 3F). Probably this amendment justifies the low tractive force presented by DIC Group (Figure 4).

The irradiated groups L1J and L3J showed blood vessels present at the site of injury (Figure 2D and 2E), different from the NT group where the presence of the vessel was on the periphery of the injured tissue. Both the Group L1J (Figure 3 G and 3H) and the L3J Group (fig. 3I, 3J) presented collagen distribution and intensity of polarized light coloration similar to the healthy group CTL (figure 3A and 3B). The DIC group presented a different collagen staining of the CTL. Probably this change can influence the stiffness of the fabric. But an investigation would be required of the proportion of collagens I and III to clarify part of this scenario.

The low-power laser therapy has been shown to be able to modulate the process of wound healing by stimulating angiogenesis, modulating the inflammation by stimulating cellular metabolism and cell proliferation (JAMES et al., 2008; CURY, 2013). This would also be related to modulation of keratinocyte activation and synthesis of collagen and promoting not only the resolution of the inflammatory process, but also the tissue repair, contributing to the improvement in quality tissue histological (SILVA, 2013).

It is well known that the laser promotes an inflammatory response shorter accelerating repair process in scar (PEREIRA et al., 2010), by stimulating angiogenesis around the site of injury and by the increase in collagen deposition, and this change in tissue array reflects on the biomechanical behavior change (MELO et al., 2011; CORR et al, 2009).

During the repair process, collagen cross-links are formed responsible for hardening of these fibers and change of mechanical properties of the fabric. These cross-links suffer changes over time and with the retrieval of the tissue (FRANK et al., 1995; PUXKANDL et al., 2002; CORR et al., 2009). In this case, the low-power laser therapy could stimulate the deposition of collagen and improve the organizational pattern of these fibres. These results may be related to the proportion of type I and III collagen present in the tissue and this would be one of the limitations of our work. Quantification of

collagen types, type I and III could help us explain the behavior of greater rigidity in the DIC group and improvement in tractive force L1J groups and L3J.

It is well known that during the repair phase, initially collagen III is synthesized and after some time a part can be targeted to collagen type I (JAMES et al., 2008). In this way, not only would the need for quantification of collagen as well as the investigation of the repair process once more, for example, 60 and 90 days after the induction of injury where probably, we would have a different scenario of these mechanical properties, mainly by changing the ratio between collagen type III to type I.

Although laser therapy presents a history of use with good clinical results, its mechanism of action has not yet been fully described (PUGLIESE et al., 2003; RICH WHITTAKER, 2005). Is already known its anti-inflammatory effect that directs for tissue repair, promoting improvement in mechanical properties of certain tissues (Carvalho et al., 2006; Melo et al., 2011; Marcos et al, 2014). Most clinical work shows the effectiveness of laser therapy in the repair of skin lesions, but few investigate histological changes related to modulation of the array elements and the Organization of collagen and this number is still less when they think of compare histological changes along the evaluation of mechanical properties of the tissue (CARVALHO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2009). However, further studies are needed to investigate the correlation between the mechanical properties of a tissue with the composition and organization of the structures of the skin.

6-CONCLUSION

From the results we can conclude that after 28 days cutting injury induction by scalpel on the skin of mice, the untreated group showed reduction of certain mechanical properties such as the reduction of tractive force at the instant of rupture and also the reduced ability of tissue deformation, indicated by the shift reduction. Treatment with diclofenac sodium topical showed no improvement of mechanical and histological properties. Llit energy 1J presented improvement in tractive force and deformation capacity, compared to the untreated group.

However, other biomechanical tests for determination of elasticity, as well as the analysis of quantification and targeting of the collagen fibers are needed for a better understanding of the mechanism of tissue repair.

7. References:

ABREU, AC; SOUSA AL; FONSECA, CLG; NUNES, JT. Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser. Scientia Medica (Porto Alegre) 2011; v21, n3, p. 96-100.

[AVCI P, GUPTA A, SADASIVAM M, VECCHIO D, PAM Z, PAM N, HAMBLIN MR](#). Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. [Semin Cutan Med Surg](#). 2013 Mar;32(1):41-52.

AZEVEDO, L.S., Laser de Helio-Neonio no processo de cicatrização de feridas em ratos. Disponível em : <www.ufpe.br/fisioterapia/lase.html-14k>.

BLANES, L., Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J.C.C. (Ed). Cirurgia Vascular: guia ilustrado. São Paulo: (s.n); p.23;2004 Disponível em: <<http://www.baptista.com>>.

CARVALHO, P.T.C., MAZZER, N., SIQUEIRA, J.F.R., FERREIRA, J.V.L., SILVA, I.S., Analise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação de laser HeNe. Fisioterapia Brasil, v. 4, n. 4, p. 253-258, jul./ago. 2003.

CARVALHO PTC, MAZZER N, REIS FA, BELCHIOR ACG, SILVA IS. Analysis of the low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. Acta Cir Bras. 2006;21(3):177- 83.

CHOUCAIR MM, PHILLIPS TJ. What is new in clinical research in wound healing. Dermatol Clin. 1997 Jan;15(1):45-58.

CORR DT, GALLANT BEHM CL, SHRIVE NG, HART DA, Biomechanical behavior of scar tissue and uninjured skin in a porcine model. Wound Repair Regen. 2009 Mar-Apr;17(2):250-9.

CURY V, MORETTI AI, ASSIS L, BOSSINI P, CRUSCA JDE S, NETO CB, FANGEL R, DE SOUZA HP, HAMBLIN MR, PARIZOTTO NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Aug 5;125:164-70. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004. Epub 2013 Jun 19.

[DAWOOD MS](#), [SALMAN SD](#). Low-level diode laser accelerates wound healing. [Lasers Med Sci](#). 2013 May;28(3):941-5.

[DA SILVA A](#), [LEAL-JUNIOR EC](#), [ALVES AC](#), [RAMBO CS](#), [DOS SANTOS SA](#), [VIEIRA RP](#), [DE CARVALHO PDE T](#). Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. [J Cosmet Laser Ther](#). 2013 Aug;15(4):210-6.

[DE MELO RAMBO CS](#), [SILVA JA JR](#), [SERRA AJ](#), [LIGEIRO AP](#), [DE PAULA VIEIRA R](#), [ALBERTINI R](#), [LEAL-JUNIOR EC](#), [DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO P](#). Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. [Lasers Med Sci](#). 2014; 29(5):1723-33.

ENOCH S, LEAPER DJ. Basic science of wound healing. Surgery (Oxford), 2005 – Elsevier

[FIÓRIO FB¹](#), [ALBERTINI R](#), [LEAL-JUNIOR EC](#), [DE CARVALHO PDE T](#). Effect of low-level laser therapy on types I, III collagen, and inflammatory cells in rats with induced third - degree burns. [Lasers Med Sci](#). 2014 Jan; 29(1):313-9.

FRANK C, MCDONALD D, WILSON J, EYRE D, SHRIVE N. Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res* 1995; 13: 157–65.

[FUKUDA TY¹](#), [TANJI MM](#), [SILVA SR](#), [SATO MN](#), [PLAPLER H](#). Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. [Lasers Med Sci](#). 2013 Sep; 28(5):1305-13.

FUNG LC, MINGIN GC, MASSICOTTE M, FELSEN D, POPPAS DP. Effects of temperature on tissue thermal injury and wound strength after photothermal wound closure. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 285-90.

GANTWERKER EA, HOM DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011 Aug;19(3):441-53. doi: 10.1016/j.fsc.2011.06.009.

GILLITZER, R., GOEBELER, M., Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 69:513-521; 2001.

GRAY, F.R.H., *Anatomia*. 29 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap. 14 , p. 891-907.

GREAVES NS, ASHCROFT KJ, BAGUNEID M, BAYAT A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*. Volume 72, Issue 3, December 2013, Pages 206-217.

GUYTON, A.C., HALL, J.E., *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

HOLLANDER DA, ERLI HJ, THEISEN A, FALK S, KRECK T, MULLER S. Standardized qualitative evaluation of scar tissue properties in an animal wound healing model. *Wound Repair Regen* 2003; 11: 150-7.

KHAVKIN J, ELLIS DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011 May;19(2):229-34. doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003.

[KHOO NK](#), [SHOKRGOZAR MA](#), [KASHANI IR](#), [AMANZADEH A](#), [MOSTAFAVI E](#), [SANATI H](#), [HABIBI L](#), [TALEBI S](#), [ABOUZARIPOUR M](#), [AKRAMI SM](#). In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. [Avicenna J Med Biotechnol](#). 2014 Apr;6(2):113-8.

LI W, DASGEB B, PHILLIPS T, LI Y, CHEN M, GARNER W, WOODLEY DT. Wound-healing perspectives. *Dermatol Clin*. 2005 Apr;23(2):181-92.

LIMA AA¹, SPÍNOLA LG, BACCAN G, CORREIA K, OLIVA M, VASCONCELOS JF, SOARES MB, REIS SR, MEDRADO AP. Evaluation of corticosterone and IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α expression after 670-nm laserphotobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar; 29(2):709-15.

LINS, R.D.A.U. et al , Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potencia no processo de reparo. *An Bras Dermatol*. V. 85 , n. 6 , p. 849-855 , 2010.

MARCOS RL, LEAL-JUNIOR EC, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUADJ R, WANG X, DEMEURIE F, MAGDALOU J, DE CARVALHO MH, LOPES-MARTINS RÁ. [Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects](#). *J Orthop Res*. 2012 Dec;30(12):1945-51.

MARCOS RL, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUADJ R, MAGDALOU J, LOPES-MARTINS RÁ. [Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis](#). *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Jan;29:272-85.

MEDRADO, A.P., SOARES, A.P., SANTOS, E.T., REIS, S.R., ANDRADE, Z.A., Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobilo B*. 18, 92(3): 144-152; 2008.

MELO VA, ANJOS DC, ALBUQUERQUE JÚNIOR R, MELO DB, CARVALHO FU. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2011 Apr;26(2):129-34

MESTER, E., MESTER, A., MESTER, E., The biomedical effects of laser aplication. *Laser Surg Med*. 5: 31-39, 1985.

[MESTER A](#). Laser biostimulation. [Photomed Laser Surg](#). 2013 Jun; 31(6):237-9.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M., Patologia: processos gerais. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

NASCIMENTO, P.M., Efeito da variacao da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirurgicas em dorso de ratos: estudo histologico. 2001. Dissertacao (Mestrado em Engenharia Biomedica) -, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraiba, São Jose dos Campos.

NEIBURGER [EJ](#). Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: a preliminary study. [Gen Dent](#). 1997 Mar-Apr;45(2):166-70.

PEREIRA MCMC, PINHO CB, MEDRADO ARP, ANDRADE ZA, REIS SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B*. 2010;98(3):188-92

POGREL MA, CHEN JW, ZHANG K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med*. 1997; 20(4):426-432.

PUGLIESE, L.S., MEDRADO, A.P., REIS, S.R.A., ANDRADE, Z.A., The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. V. 17, n. 14, p.307-313; 2003.

PUXKANDL R, ZIZAK I, PARIS O, KECKES J, TESCH W, BERNSTORFF S, PURSLOW P, FRATZL P. Viscoelastic properties of collagen: *synchrotron radiation investigations and structural model*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357: 191-7.

QUIRINIA A, VIIDIK A. Diclofenac and indomethacin influence the healing of normal and ischaemic incisional wounds in skin. [Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg](#). 1997 Sep;31(3):213-9.

RESENDE, M.A.; PEREIRA, L.S.M.; CASTRO, M.S.A., Proposta de um modelo teorico de intervencao fisioterapeutica no controle da dor e inflamacao. *Fisioterapia Brasil*, v. 6, n. 5, p. 368-371, set. /out. 2005.

1
2
3
4 RIBEIRO MA, ALBUQUERQUE RL, RAMALHO LM, BONJARDIM LR, DA CUNHA SS.
5 Immunohistochemical assessment of myofibroblastic and lymphoid cells during wound
6 healing in rats submitted to laser photobiomodulation at 660nm. *Photomed Laser Surg.*
7 2009;27:49-55.
8
9

10
11
12 RICH L, WHITTAKER P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light
13 assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci.* 2005;22:97-104.
14
15

16
17 ROCHA JUNIOR, A.M., Low-level laser therapy and wound healing in humans. *J Vasc*
18 *Bras.* V. 6, n.3, p. 258-266, 2007.
19
20

21
22 ROLIN GL, BINDA D, TISSOT M, VIENNET C, SAAS P, MURET P, HUMBERT P. In
23 vitro study of the impact of mechanical tension on the dermal fibroblast phenotype in the
24 context of skin wound healing. *J Biomech.* 2014 Sep 19. pii: S0021-9290(14)00396-0
25
26

27
28
29 SAMPAIO, S.A.P, RIVITTI, E.A., *Dermatologia*. 2 ed. São Paulo: Artes Medicas, 2001.
30 cap. 1 , p. 6-35.
31
32

33
34 SCHREML S, SZEIMIES RM, PRANTL L, LANDTHALER M, BABILAS P. Wound
35 healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol (PRINT)*. 2010 Nov;63(5):866-81.
36
37

38
39
40 SILVA EB, MANISCALCO CL, ESPER GVZ, GUERRA RR, KERPPERS II. Analises
41 macro e microscópicas de enxertos cutâneos por sementeira após laserterapia de
42 baixa intensidade . *Rev Col Bras Cir.* Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc> [
43 periódico na internet] 2013; 40(1).
44
45

46
47
48 VAN BREUGEL HH, BÄR P. Power density and exposure time of He-Ne laser
49 irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human
50 fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1992;12(5):528-537.
51
52

53
54
55 VILELA, A.L.M., Sistema Tegumentar: estrutura do tegumento pele. Disponível em:
56 <<http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>>.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

WOOD FM. Skin regeneration: The complexities of translation into clinical practise. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Available online 29 October 2014.

Group	Wavelength (nm)	Type of diode laser	Mean Power Output (mW)	Spot Size (cm ²)	Power Density (W/cm ²)	Energy (J)	Energy Density (J/cm ²)	Time per point (s)
L1J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	1	35.71	10
L3J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	3	107.14	30

Figure 1: Table of parameters of laser irradiation

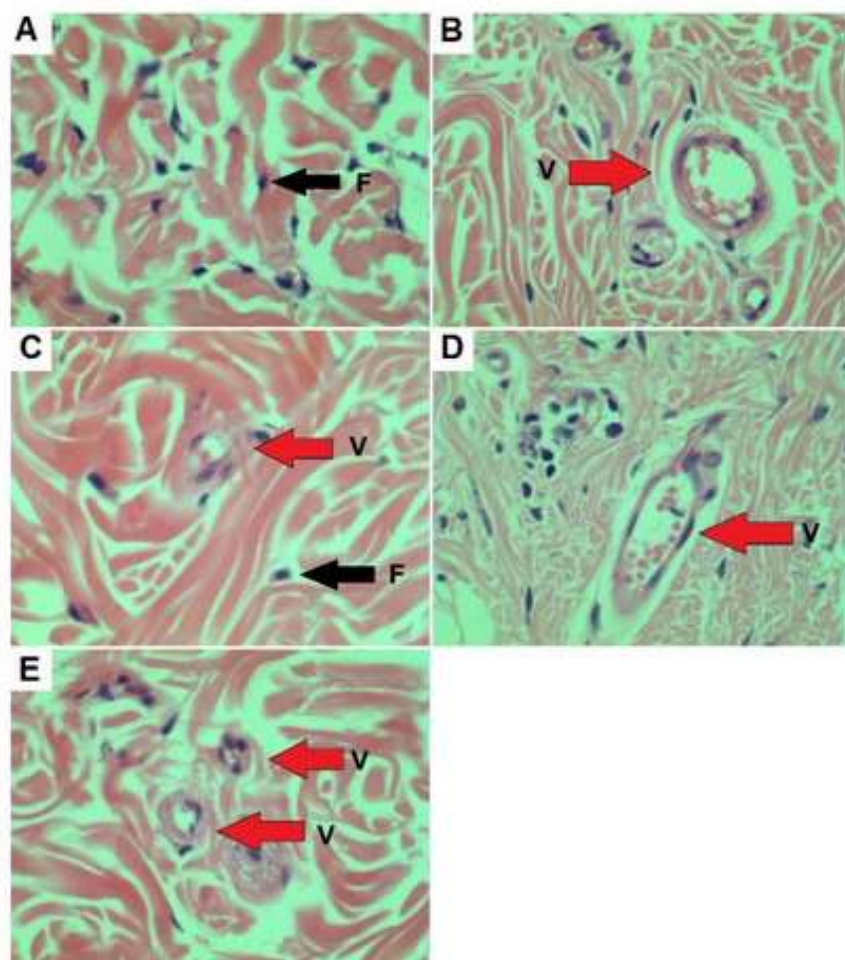


Figure 2: skin histological Images in different groups indicated as: CTL (A); NT (B); DIC (C); L1J (D) and (E) L3J. Pictures for colouring by hematoxylin and eosin (400 x). Indication for fibroblasts (black arrow) and the presence of blood vessel (red arrow) on the site of the scar.

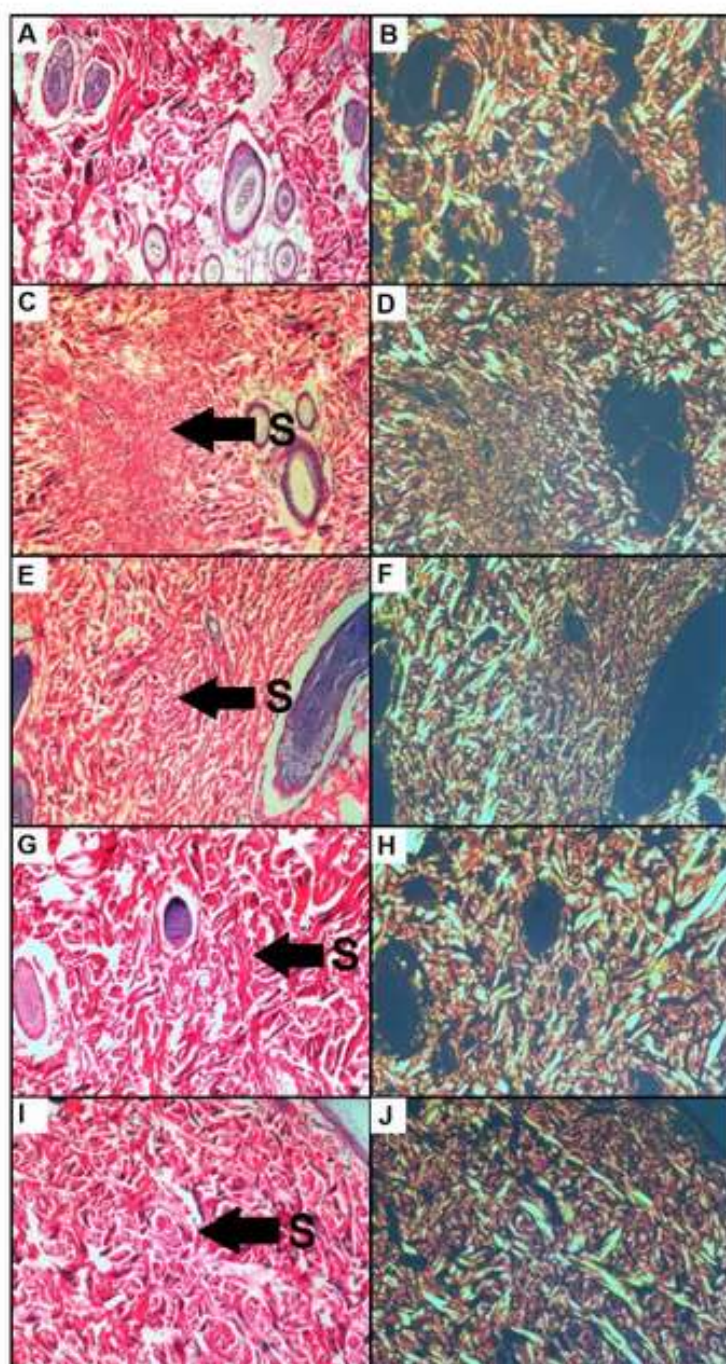


Figure 3: histological Images of the skin in different groups indicated as: CTL (A, B); NT (C, D); DIC (E, F); L1J (G, H) and L3J (I, J). Pictures for colouring by Picrosirius red without bias (A, C, E, G, I-100 x) and by Picrosirius red with polarization of light (B, D, F, H, J – 100 x). Indication of the location of the scar (black arrow).

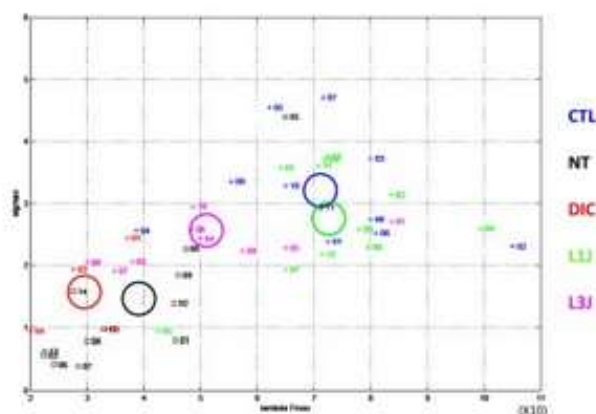


Figure 4: graph of the relationship between the maximum traction force and the maximum displacement during the moment of rupture of the fabric, the mechanical traction test of skin. Groups: CTL (control), NT (untreated), DIC (diclofenac), L1J (laser 1J), L3J (laser 3J).

EFFECT OF LOW LEVEL LASER (830NM) IN THE HEALING PROCESS IN RAT SKIN. BIOMECHANICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS.

Cruz, LGB¹; Lopes-Martins²; Torres-Silva, R¹; Leal-Junior, EC¹; Pallotta, RC¹; de Carvalho, PTC¹; Frigo, L³; Rahouadj, R⁴; Arnold, G⁴; Marcos, RL¹.

- 1- University of Nove de Julho
- 2- University of Mogi das Cruzes
- 3- University Cruzeiro do Sul
- 4- University of Lorraine