

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RACHEL BHARBARA MACCHERONIO DALMASO

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
E DO DICLOFENACO DE SÓDIO NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO EM PELE DE RATOS.**

São Paulo, SP

2014

RACHEL BHARBARA MACCHERONIO DALMASO

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DO
DICLOFENACO DE SÓDIO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM PELE
DE RATOS.**

**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.**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

**São Paulo, SP
2014**

Dalmaso, Rachel Bharbara Maccheronio.

Efeito da associação do laser de baixa intensidade e do diclofenaco de sódio no processo de cicatrização em pele de ratos./ Rachel Barbara Maccheronio Dalmasso, 2015.

60 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 615.831

São Paulo, 17 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): RACHEL BHARBARA MACCHERONIO DALMASO

Titulo da Dissertação: "Efeito da associação do laser de baixa intensidade e do diclofenaco de sódio no processo de cicatrização em pele de ratos"

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS 

Membro: PROFA. DRA. RAQUEL APARECIDA CASAROTTO 

Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR 

"Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

- Leonardo da Vinci

Dedicatória:

Dedico este trabalho a minha mãe, Sandra, que sempre me fez acreditar na realização dos meus sonhos e trabalhou muito para que eu pudesse realizá-los. Pelas simples palavras “você consegue” nos momentos em que mais precisei. Pelo amor, compreensão, apoio que você me mostra todos os dias confirmando que não existe distância no amor.

Agradecimentos:

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha família por me apoiar em minhas escolhas, me ajudando no caminho.

As minhas amigas, Cintia e Janille, que fizeram parte destes momentos sempre me incentivando. Por me ajudar através das risadas principalmente nos momentos de incerteza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, por ter me conduzido nos caminhos da ciência de forma brilhante e paciente. Sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa pela ajuda e companheirismo durante essa aventura.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

A todos, muito obrigada.

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 - prostaglandin E2

IL1- β - Interleucina-1 beta

LBP – Laser de Baixa Potência

MMP – Metaloproteinase da Matriz

mW – MiliWatt

nm – Nanômetro

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

I.M. – intramuscular

AsGaAI - 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 - Rígidez secante

°C – graus célsius

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema dos grupos experimentais.....	23
Figura 2: Tabela com os parâmetros de irradiação laser.....	24
Figura 3: Gráfico do ensaio de tração.....	25
Figura 4: Gráfico da força de tração máxima durante o momento de ruptura do tecido, no teste de tração mecânica da pele.....	27
Figura 5: Gráfico do deslocamento máximo durante o momento de ruptura do tecido, no teste de tração mecânica da pele.....	28
Figura 6: Gráfico da relação entre a força máxima de tração e o deslocamento máximo durante o momento de ruptura do tecido.....	29
Figura 7: Imagens histológicas da pele.....	30

ANEXO:

Submissão do artigo: Effect of the association of low intensity laser and diclofenac sodium in the process of healing in rat skin45

RESUMO

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 e sua associação com o anti-inflamatório Diclofenaco de sódio, no processo de reparo da pele de ratos, após a indução de um processo lesivo, observando aspectos morfológicos e biomecânicos. Foram utilizados ratos wistar, entre 150g à 200g, com 3 meses de idade. Após anestesiados, foram realizadas 2 lesões cortantes no dorso do animal, utilizando um bisturi cirúrgico. Os animais foram divididos em 5 grupos de 5 animais: Controle (CTL), Cicatriz sem tratamento (NT), Cicatriz + anti-inflamatório (DIC), cicatriz + laser 3J (L3J) e cicatriz + associação laser 3J e diclofenaco de sódio (L+D). 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: O grupo NT apresentou redução das propriedades mecânicas e alterações nas análises histológicas. Tanto o grupo DIC quanto o grupo L3J apresentou significativa melhora das propriedades mecânicas e na organização histológica. O grupo L+D apresentou maior deformação quando comparado ao grupo NT. Conclusão: Concluímos que a utilização do diclofenaco de sódio da laserterapia melhoraram determinadas propriedades mecânicas da pele neste modelo de lesão. A associação da laserterapia com a farmacoterapia parece alterar estas propriedades mecânicas. 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 to evaluate the effect of low power laser therapy and its association with the anti-inflammatory Diclofenac sodium, in the healing process of rat skin, after induction of a lesion process, morphological and biomechanical aspects were observed. Male Wistar rats between 150g to 200g, 3 months old were used. Once anesthetized, 2 lesions were performed using a surgical scalpel on 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 + 3J laser (L3J) and scar + 3J laser and diclofenac sodium association (L + D). 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: The NT group showed a reduction of mechanical properties and alterations in histology analysis. Both the DIC and L3J groups showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. The L + D group showed greater deformation when compared to the NT group. We conclude that the use of diclofenac sodium and laser therapy improves certain mechanical properties of skin in this lesion model. The combination of laser therapy with pharmacotherapy seems to change these mechanical properties. 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.

Keywords: Scar, Laser Therapy, Collagen, Mechanical properties, Diclofenac sodium

INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Processo de Reparo da Pele.....	14
1.2 Colágeno e Propriedades Mecânicas da Pele.....	16
1.3 Tratamentos e Terapias.....	17
1.4 Laser.....	18
2- OBJETIVO.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específico.....	21
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Indução da Cicatriz.....	22
3.3- Grupos Experimentais.....	22
3.4- Aplicação da Terapia cm Laser de Baixa Potência (LPB).....	24
3.5- Propriedades Mecânicas da Pele.....	24
3.6- Preparação Histológica das Amostras.....	26
3.7- Análise Estatística.....	26
4- RESULTADOS.....	27
5- DISCUSSÃO.....	32
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1- INTRODUÇÃO

A pele 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 e embora os limites entre as porções de tecido epitelial e conjuntivo da pele sejam bem descritos, alguns elementos fibrosos da derme misturam-se com os da hipoderme, não havendo uma delimitação nítida entre tais camadas (COTRAN, 2000).

Esta divisão celular 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, pode-se encontrar variações estruturais, citológicas e histológicas quando é avaliado amostras de pele de diferentes áreas do corpo humano (SAMPAIO, 2001).

A epiderme é a camada mais superficial sendo constituída por epitélio estratificado com espessura variada. 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 (GRAY, 1988).

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 e ao mesmo tempo impede perdas de água e eletrólitos, atuando na termorregulação através da sudorese, constrição e dilatação da rede vascular cutânea, proporcionando o controle homeostático da temperatura orgânica (GUYTON, 2002).

1.1 Processo de Reparo da Pele

Pelo fato de representar mais de 15% do peso corpóreo e devido sua grande extensão, suas características topográficas e o fato de ser um órgão de revestimento, a pele está sujeita a agressões durante todas as fases de vida do ser humano, com desenvolvimento de um tecido cicatricial com características muitas vezes diferentes do tecido original, sendo objeto de preocupação no intuito de protegê-la, evitando complicações relacionadas à sequelas que podem comprometer a atividade do indivíduo levando ao afastando do trabalho ou a aposentadoria precoce por invalidez (BLANES 2004).

A cicatrização é um processo 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, 1985; CANDIDO, 2001).

Este processo pode ser dividido 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 quimiotáxicos 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, 2002; VILELA, 2006).

Na fase proliferativa ocorrerá à multiplicação no número de células das linhagens celulares que estão na região e de fibroblastos, junto com a produção de elementos estruturais que preencherão a lesão, favorecendo o reparo do tecido conectivo e do epitélio, formando um tecido de granulação com aspecto granuloso e avermelhado (RESENDE, 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 remodelação, as células fagocitárias irão absorver os tecidos em excesso e determinadas colagenases 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 tornará menos espessa, passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (GUYTON, 2002).

Durante o processo de reparo, diferentemente da cicatrização, pode haver a regeneração onde o tecido não se restabelece, sendo recriado. Dessa forma, no processo de reparo tecidual, a regeneração e a cicatrização devem ser consideradas como eventos distintos, agindo em conjunto a fim de manter 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, 2001; AZEVEDO, 2004; BLANES, 2004).

1.2 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 da 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 podem 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.

1.3 Tratamentos e Terapias

Apesar dos grandes avanços na compreensão das diversas fases do reparo tecidual, a incidência e prevalência de úlceras crônicas são extremamente altas. Neste sentido, vários fatores podem influenciar na alteração do reparo tecidual, entre elas o processo de envelhecimento, doenças cardiovasculares, diabetes, neoplasias, hipotireoidismo, alterações nutricionais como desnutrição, deficiências vitamínicas e o uso excessivo de medicamentos (FREITAS, 2002). Estes fatores têm mobilizado a indústria farmacêutica e de cosméticos a desenvolverem produtos específicos adequados para cada tipo de lesão na pele (BUFALARI, 1996; BIONDO-SIMÕES, 2005).

Alguns dados estatísticos demonstraram que são gastos cerca de 750 milhões de euros ao ano no tratamento de feridas na Europa. Nos Estados Unidos este valor chega a 600 milhões de dólares ao ano (EWMA / WUWHS). No Brasil não há dados estatísticos precisos sobre o número de portadores de feridas cutâneas crônico, porém sabe-se que sua cronificação tem um impacto

psíquico, social e econômico na população, representando a segunda causa de afastamento do trabalho. (MONTENEGRO, 1999). Tais fatos justificam a necessidade de estudos cada vez mais abrangentes neste tema visando minimizar o estigma social e econômico que o problema das feridas causa atualmente em nosso país.

A oxigênioterapia hiperbárica é uma técnica a partir de métodos físicas, 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, ainda 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.

1.4 Laser

A terapia com laser de baixa potência é conhecida por sua importante ação na fase inflamatória, ativando queratinócitos e sintetizando colágeno promovendo não só a resolução do processo inflamatório, mas também o reparo tecidual, contribuindo para a melhora na qualidade histológica do tecido (SILVA, E.B., 2013). Os primeiros estudos publicados por Mester (1985), Van Breugel (1992 e PoGrel (1997) utilizando o laser de baixa potência no reparo tecidual permitiram que esta terapia fosse aprovada pelo Food and Drug Administration norte-americano (FDA) como um importante método de promoção do processo de cicatrização. (ROCHA JUNIOR, 2007).

Considera-se que este reparo tecidual se deve a modificações histológicas através da redução do infiltrado inflamatório, do aumento do tecido de granulação, da epiteliação, do aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de matriz extracelular rica em colágeno além de neovascularização, o que contribuiria para uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial. (PUGLIESE *et al*, 2003; CARVALHO *et al*, 2003; ROCHA *et al*, 2006).

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

Em relação ao seu possível mecanismo de ação no processo de cicatrização da pele, 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 laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas colagenases (MMPs) e consequentemente reduzir a degeneração do tecido, favorecendo o rearranjo das fibras de colágeno, levando a uma melhora nas condições biomecânicas em tecidos pouco vascularizados durante o processo de reparo (BJORDAL *et al*, 2006; PIRES *et al*, 2011; GUERRA *et al*, 2013; MARCOS *et al*, 2013).

Em relação ao comprimento de onda, os primeiros estudos demonstraram que o laser 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 mostrando que o laser

infravermelho promove um aumento na resistência à tração em pele de ratos diabéticos (REDDY *et al*, 2003). Existem ainda poucos trabalhos utilizando a terapia com laser de baixa potência vermelho e infravermelho associado a fármacos com eficácia na promoção da cicatrização pós-cirúrgica em pacientes diabéticos (MINATEL *et al*, 2009).

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

Contudo, a literatura a respeito da terapia com laser de baixa intensidade na aceleração da cicatrização de feridas é muito controversa, uma vez que uma parte dos estudos mostram resultados positivos enquanto outra parte mostra pouco ou nenhum efeito neste processo de reparo. Estas disparidades podem estar relacionadas aos diferentes protocolos utilizados pelos autores (DAMANTE *et al*, 2008).

Atualmente, acredita-se que o laser possui uma ação moduladora no processo inflamatório podendo tanto bioestimular quanto bioinibir a cicatrização através da determinação 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 em relação à dosimetria exata a ser administrada para cada tipo de tratamento ou para cada patologia ou processo a ser abordado (LINS, 2010; Abreu, 2011).

Tendo em vista os fatos apresentados anteriormente, a importância de estudos demonstrando o efeito reparador do laser de baixa potência, bem como a compreensão de sua associação com terapia farmacológica considerada a terapia tradicional, representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde. No entanto poucos estudam abordam aspectos funcionais e biomecânicos do laser de baixa potência no processo de cicatrização da pele.

2 OBJETIVO

2.1 Geral:

- Avaliar a ação do laser de baixa potência (830nm) e sua associação com terapia farmacológica utilizando diclofenaco de sódio no reparo tecidual após indução de lesão na pele.

2.2 Específico:

- Analisar o comportamento mecânico da pele, 28 dias após o processo lesivo e a ação das terapias farmacológica e laserterapia no reparo tecidual.
- Observar as alterações histológicas na pele, 28 dias após a lesão e a ação das terapias farmacológica 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 cetamina e xilazina (90mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, injeção intraperitoneal). Após a anestesia, foram realizadas 2 incisões cirúrgicas longitudinais de 12 cm na região central do dorso no animal, utilizando um bisturi cirúrgico nº 15.

Os animais foram divididos em 5 grupos de 7 animais, conforme indicado abaixo nos grupos experimentais. O tratamento farmacológico e a terapia laser foram realizados imediatamente após a indução das incisões e mantida a irradiação diária até o sétimo dia. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados com hiperdosagem do mesmo anestésico e o retalho na região na incisão foi retirado para análises histológicas e de ensaios de tração. Cada retalho teve como dimensões, 15 cm de comprimento e 5 cm de largura.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em diferentes grupos, conforme indicado na figura 1.

- Grupo Controle (CTL): Animais com pele íntegra.

- Grupo com lesão e não tratado (NT): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e sem tratamento, sacrificados após 28 dias a partir da indução da corte.
- Grupo com lesão e tratado com Diclofenaco de sódio (DIC): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com injeções diárias de Diclofenaco de Sódio (1mg/kg I.M.). O primeiro tratamento foi realizado imediatamente após a indução do corte na pele do animal e mantido até o sétimo dia do início da lesão.
- Grupo Irradiado (L3J): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com laserterapia no comprimento de onda de 830nm, 3J de energia e 100mW de potência.
- Grupo Associação Laser e Diclofenaco de sódio (D+L): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com diclofenaco de Sódio (1mg/kg I.M.) e laserterapia (830nm, 3J, 100mW) respectivamente. O tratamento associado foi imediatamente após a indução da corte na pele do animal e mantido até o sétimo dia do início da lesão.

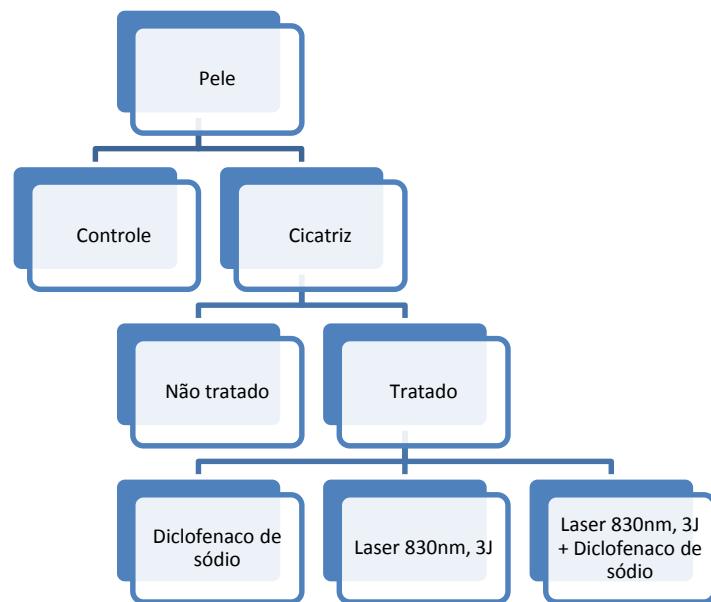


Figura 1. Esquema dos grupos experimentais

3.4 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 com 3J de energia e 100mW de potência, diâmetro do feixe de 0,028cm² (Thera Lase, DMC®), imediatamente após o processo lesivo (figura 2). As irradiações foram pontuais (único ponto), por contato durante 7 dias.

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)
L3J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	3	107.14	30
D+L	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	3	107.14	30

Figura 2: 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 e retalhos da pele na região dorsal onde foi induzida a incisão, cirúrgica, com dimensões de 5mm de largura e 10mm de comprimento, foram removidos para posteriores análises. Parte deste material foi utilizado imediatamente após a retirada, nos ensaios de tração para a avaliação de suas propriedades mecânicas. A atividade normal da pele é formada por um conjunto de tensões aplicadas no tecido, divididas em forças de carregamento e descarregamento. Desta forma, foi aplicada uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais da pele (figura 3A).

Primeiramente foram realizadas as medidas de comprimento, largura e altura do retalho. Estes valores foram utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. Cada extremidade da pele foi fixado em grampos para cada extremidade do retalho de pele, no aparelho de ensaio

mecânico (EMIC200). Vários testes de carregamento e descarregamento de forças serão realizados até o momento da ruptura do tecido, conforme indicado na figura abaixo.

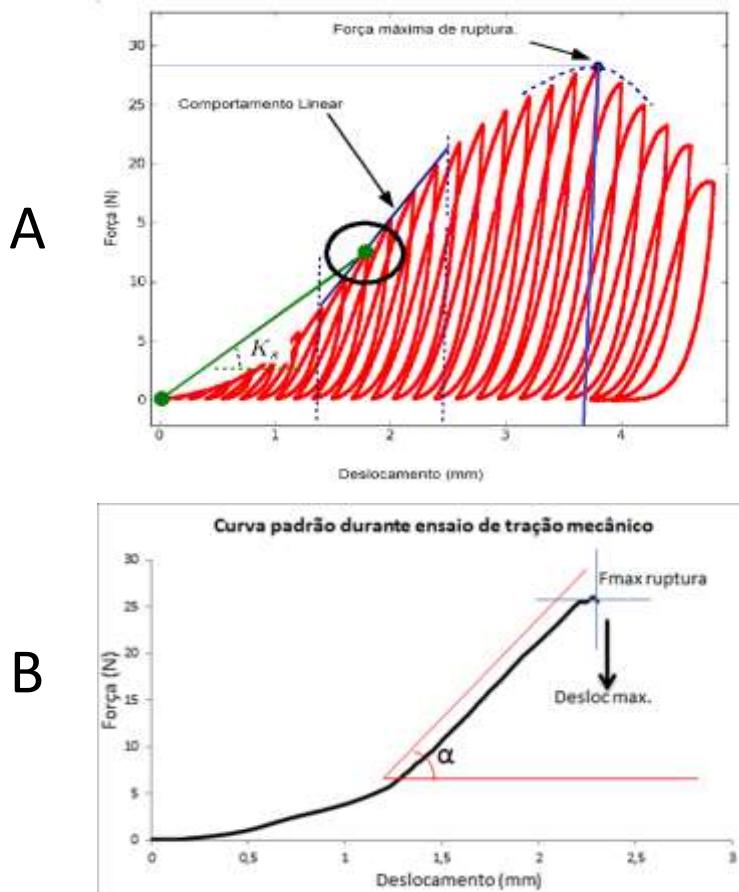


Figura 3: Gráfico do ensaio de tração. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.

Durante a padronização do ensaio de tração, foi utilizada uma velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0,5mm durante cada carregamento. O teste de tração mecânico foi interrompido automaticamente (figura 3B), 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})
- Rígidez (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, em seguida 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 5 μ m e transferidos para lâminas histológicas onde foram desparafinadas e hidratadas. Foram utilizadas 2 colorações: 1^a) Hematoxilina e Eosina, para possibilitar a visualização de determinadas estruturas como vasos sanguíneos, células e matriz extracelular, 2^a) Picrosírius red, para visualização do colágeno.

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:

Na figura 4, observamos um gráfico da força máxima, no momento da ruptura da pele, no ensaio de tração cíclico. Os grupos NT, DIC, L3J e D+L apresentaram força máxima de tração menor quando comparados ao grupo CTL. Somente os grupos DIC e L3J apresentaram aumento significativo desta força no instante da ruptura do tecido.

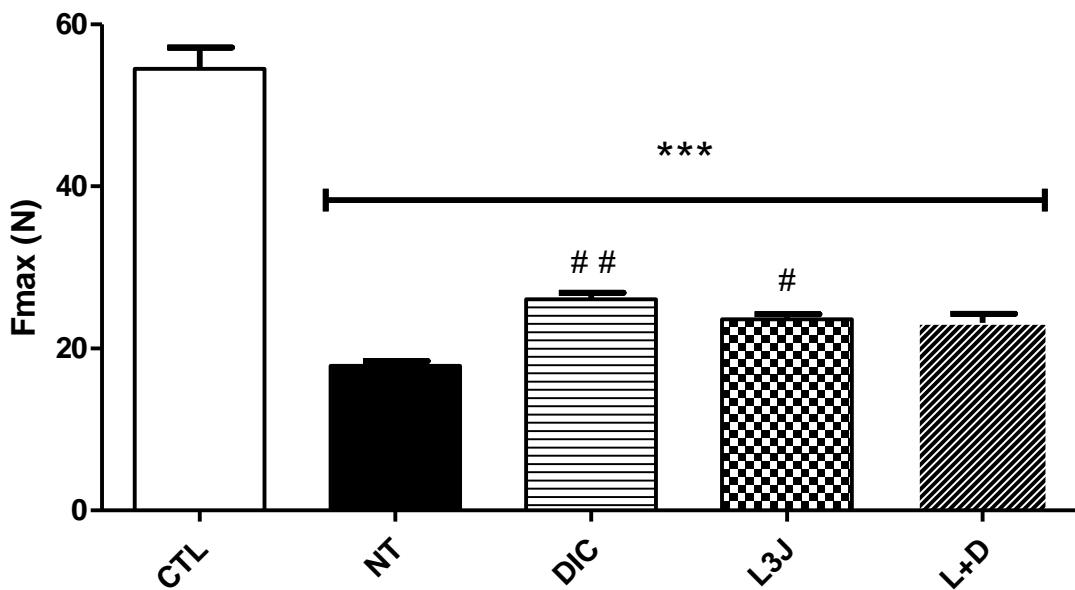


Figura 4: Gráfico da força de tração máxima durante o momento de ruptura do tecido, no teste de tração mecânica da pele. Grupos: CTL (controle), NT (não tratado), DIC (diclofenaco), L3J (laserterapia 3J), D+L (associação com diclofenaco e laser). *** p<0,001 vs CTL e # p<0,05 ou # # p<0,01 vs NT.

Na figura 5 observamos o gráfico do deslocamento máximo obtido por cada grupo experimental durante o teste de tração mecânico. Novamente, é possível observar que todos os grupos lesionados apresentaram redução da capacidade de deformação representada pelo deslocamento em milímetros.

Apenas o grupo D+L apresentou aumento destes valores, quando comparado ao grupo NT.

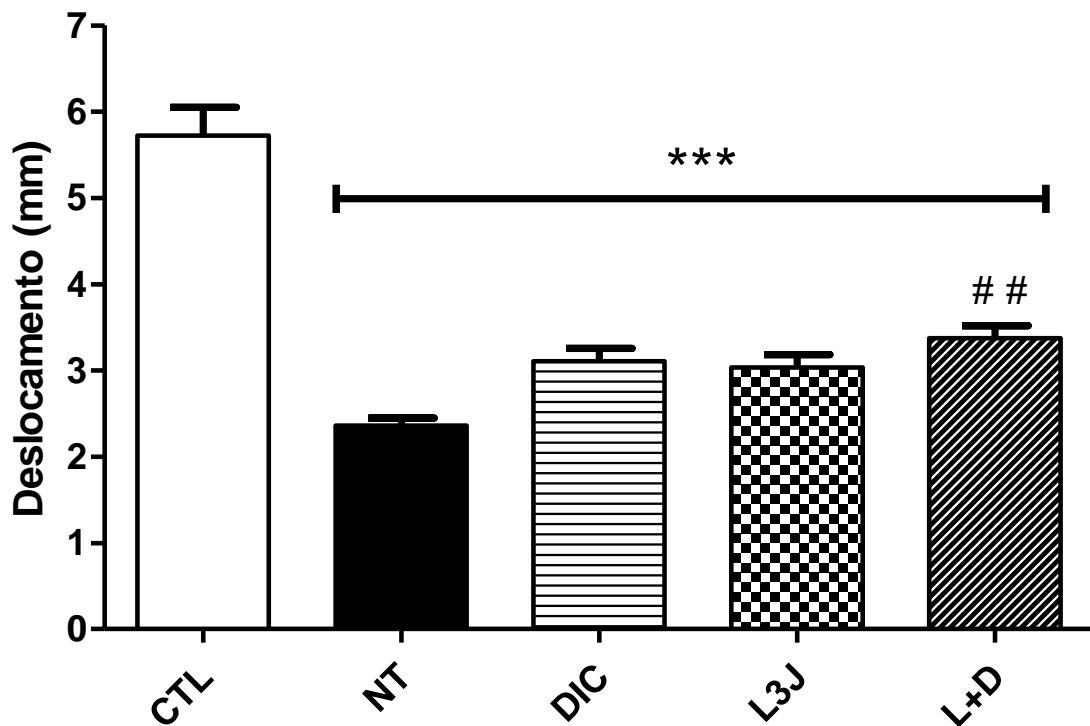


Figura 5: Gráfico do deslocamento máximo durante o momento de ruptura do tecido, no teste de tração mecânica da pele. Grupos: CTL (controle), NT (não tratado), DIC (diclofenaco), L3J (laserterapia 3J), D+L (associação com diclofenaco e laser). *** p<0,001 vs CTL e # # p<0,01 vs NT.

O gráfico da figura 6 mostra a relação entre os valores da força máxima de tração e o seu respectivo deslocamento no momento da ruptura do tecido, durante o ensaio de tração. Foi observado um deslocamento dos grupos lesionados para baixo do grupo controle. O grupo NT apresentou um deslocamento ainda maior.

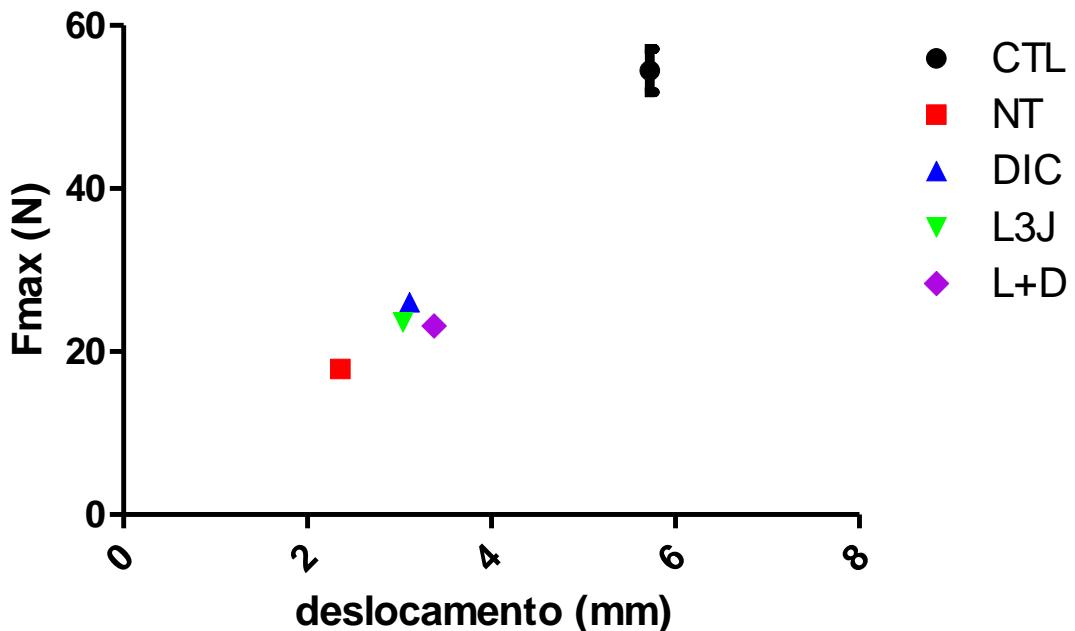


Figura 6: Gráfico da relação entre a força máxima de tração e o deslocamento máximo durante o momento de ruptura do tecido, no teste de tração mecânica da pele. Grupos: CTL (controle), NT (não tratado), DIC (diclofenaco), L3J (laserterapia 3J), D+L (associação com diclofenaco e laser).

A figura 7 mostra a sequência histológica dos diversos grupos, saudável e lesionado, nos diferentes tratamentos. É possível observar na primeira coluna o local da cicatriz (seta preta) em cada tecido e a presença de vasos sanguíneos (seta branca).

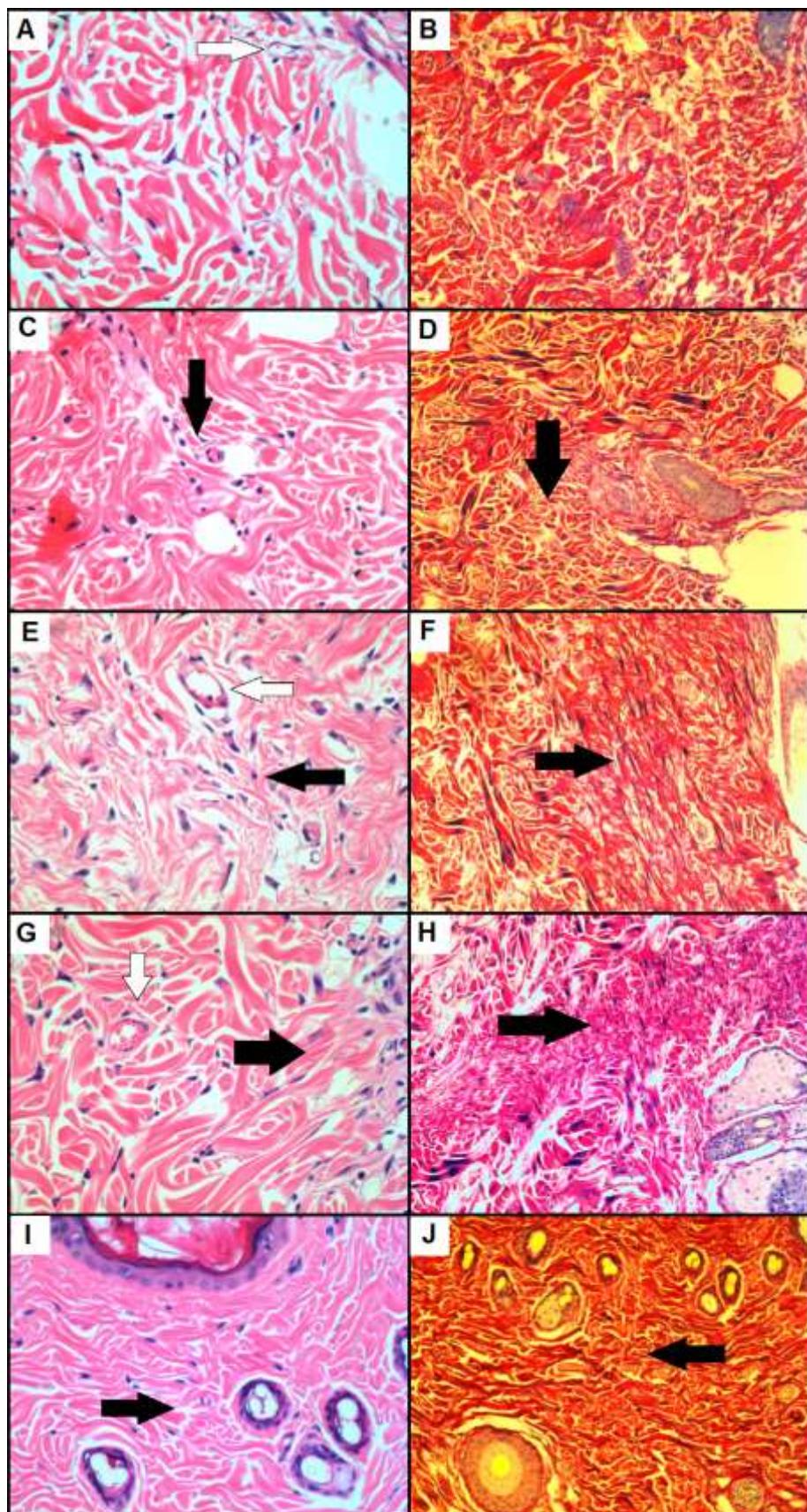


Figura 7: Imagens histológicas da pele nos diferentes grupos indicados como: CTL (A, B); NT (C, D); DIC (E, F); L3J (G, H) e D+L (I, J). Imagens para coloração

por Hematoxilina e Eosina (A, C, E, G, I – 200X) e por Picrosírus red (B, D, F, H, J – 100X). Indicação do local da cicatriz (seta preta) e da presença de vaso sanguíneo (seta branca)

5- DISCUSSÃO

A pele é um órgão complexo que determina os limites entre o meio interno e externo, exercendo várias funções relacionadas à defesa contra agentes externos, regulação térmica, controle do fluxo sanguíneo e ação neurosensorial (KHAVKIN & ELLIS, 2011; WOOD, 2014). Por esses motivos, a pele pode sofrer contínuos processos lesivos, levando à formação de um tecido cicatricial, de característica fibrosa, alterando assim suas propriedades específicas (WOOD, 2014).

Neste trabalho mostramos que o reparo tecidual da pele, após o processo lesivo induzido por bisturi, é alterado no grupo NT, com redução da força máxima e da capacidade de deformação no momento da ruptura. Ao contrário, a terapia farmacológica com a utilização de diclofenaco de sódio injetável (DIC) e a terapia com laser de baixa potência (L3J) apresentaram melhora destas propriedades quando comparado ao grupo não tratado (NT). A associação das duas terapias (diclofenaco de sódio e laser de baixa potência – D+L) aumenta a capacidade de deformação do tecido cicatricial.

A restauração destas características, reduzidas durante o processo lesivo torna-se um fator importante que busca a integridade da pele e restabelecimento de sua homeostase (CHOUCAIR & PHILLIPS, 1997; LI *et al*, 2005; GREAVES *et al*, 2013). Este processo fisiológico complexo que visa a restauração da integridade da pele geralmente é dividido em algumas fases como: hemostase, inflamatória, formação de tecido de granulação, re-epitelização, terminando no remodelamento tecidual (CHOUCAIR & PHILLIPS, 1997; ENOCH & LEAPER, 2005; ROLIN *et al*, 2014).

A fase inflamatória é essencial para o direcionamento do reparo. Nesta fase, uma variedade de sinalizações intracelulares é ativada promovendo 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, 2011). Este tecido formado durante o reparo pode apresentar alterações quantitativas e qualitativas na distribuição de colágeno que interfere diretamente nas propriedades mecânicas da pele (Torres-Silva, 2014; Marcos 2014).

Apresentamos neste trabalho o modelo experimental de lesão de pele no dorso do animal induzido por bisturi, que se assemelha às suturas encontradas em procedimentos cirúrgicos. Como terapia para promoção deste reparo, utilizamos a terapia farmacológica pelo Diclofenaco de sódio, a terapia com laser de baixa potência e ainda a associação destas duas terapias (farmacológica e laserterapia).

A escolha do fármaco está relacionada a trabalhos anteriores que demonstraram que alguns anti-inflamatórios como o diclofenaco de sódio, quando utilizados no tratamento de feridas, apresentam melhora do quadro inflamatório nos primeiros dias de tratamento. Contudo, após 3 semanas de tratamento o tecido cicatricial pode sofrer alterações mecânicas tornando mais frágeis, aumentando as chances de ruptura (QUIRINIA & VIIDIK, 1997).

O parâmetro utilizado para irradiação foi o laser Diodo de 830nm, 3J, 100mW e 0,028cm² de diâmetro do feixe. Estes valores foram transportados de trabalhos anteriores onde foi observada a ação do laser na modulação do processo inflamatório com melhora das propriedades mecânicas (Marcos *et al*, 2014; Torres *et al*, 2014).

Ambas as terapias, farmacológica com diclofenaco de sódio e não farmacológica, com o uso do laser de baixa potência, foram iniciadas imediatamente após a indução da lesão e foram mantidos o tratamento diário até o 7º dia. Levando em consideração a fase inflamatória iniciar-se imediatamente após a lesão e permanecer por alguns dias, o tratamento utilizado aqui provavelmente interferiu na fase inflamatória da lesão servindo como modulador ou inibidor do processo inflamatório, influenciando o reparo pela capacidade do laser em reduzir importantes mediadores inflamatórios (MARCOS,2012 and 2014).

Neste trabalho, foi possível observar uma redução na força de tração em todos os grupos em que a lesão foi induzida (NT, DIC, L3J e D+L) quando comparados ao grupo controle (CTL). Porém, os grupos DIC e L3J apresentaram melhora nestas forças quando comparados ao grupo NT.

Foi observado ainda redução na capacidade de deformação, apresentada pela alteração no deslocamento registrado no momento da ruptura do tecido. Neste caso, os grupos NT, DIC e L3J apresentaram redução da capacidade de deformação. Já o grupo D+L apresentou melhora na capacidade de deformação, quando comparado ao grupo NT.

O fato de o tecido lesionado apresentar uma redução significativa de suas propriedades mecânicas de tração realça ainda a necessidade de ampliar os estudos sobre os tratamentos clínicos destes tipos de lesões a fim de restaurar o comportamento biomecânico da pele no local da cicatriz. Da mesma forma, a determinação da força máxima de ruptura nos fornece meios para a compreensão e avaliação da qualidade da ferida, bem como sua progressão após intervenções cirúrgicas (CORR *et al*, 2009)

Neste sentido, a avaliação das propriedades é fundamental para compreender seu comportamento frente ao processo lesivo ou mesmo de outros eventos, como no envelhecimento ou ainda para conhecer a eficácia de diferentes tratamentos e terapias (FUNG *et al*, 1999; HOLLANDER *et al*, 2003).

Comparando estes dados biomecânicos com as figuras histológicas, foi possível observar que o grupo NT apresentou uma desorganização da matriz extracelular e alteração na intensidade de colágeno, observado nas figuras 7C e 7D, quando comparados ao grupo Controle (7A e 7B).

Ainda analisando os resultados histológicos, novamente os grupos DIC e L3J apresentaram uma melhor organização da matriz e da disposição do colágeno (figuras 7E, 7F e 7G, 7H, respectivamente). O grupo L3J apresentou uma coloração de colágeno mais acentuada no local da cicatriz. Provavelmente esta alteração pode influenciar na rigidez do tecido. Porém seria necessária uma investigação da proporção de colágenos I e III para esclarecer parte deste 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, 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, 2013).

Em relação às analise histológicas para a coloração por Hematoxilina e Eosina, foi possível observar a ausência de vasos próximos à região da lesão. Neste caso o tecido poderia ter um comprometimento do aporte sanguíneo, fundamental para o adequado reparo da pele. Ao contrário, foi observada a formação de pequenos vasos muito próximos à região da lesão nos grupos DIC e L3J, o que facilitaria o reparo pela melhora deste aporte sanguíneo.

É conhecido que o laser promove uma resposta inflamatória mais curta acelerando o processo de reparo na cicatriz (PEREIRA *et al*, 2010), por estimular a angiogênese próximo do local da lesão e pelo aumento na deposição de colágeno na matriz extracelular, refletindo na melhora 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 com a recuperação do tecido (FRANK *et al*, 1995; PUXKANDL *et al*, 2002; CORR *et al*, 2009). Neste caso, tanto a terapia farmacológica quanto a laserterapia poderia estimular a deposição de colágeno e melhorar o padrão organizacional destas fibras.

Ao analisar a figura 6, observamos a relação entre os valores da força máxima com o deslocamento, ambos no momento da ruptura. A partir deste gráfico, é possível traçar uma reta até o grupo controle e observar o ângulo formado a partir do início do eixo. Podemos observar que os grupos DIC e L3J apresentaram angulação muito próxima ao grupo CTL, obviamente com valores reduzidos quando comparados ao tecido saudável. Podemos observar também que o grupo D+L apresentou ligeira queda desta angulação, sugerindo uma maior capacidade de deformação.

Em relação aos parâmetros de irradiação deste trabalho, o grupo irradiado com 3J apresentou melhora tanto nos aspectos histológicos, na formação de

novos vasos e organização do colágeno, quanto nos aspectos biomecânicos, pela melhora da força de ruptura e capacidade de deformação.

Trabalhos anteriores demonstraram que estes mesmos parâmetros de irradiação (3J e 100mW) foram eficaz na redução de importantes mediadores inflamatórios como COX-2, TNF-a, bem como na redução de edema e importantes enzimas MMPs que degradam o colágeno (Marcos 2011; Marcos 2012; Torres-Silva 2014). Outro autor apresentou melhora na cicatrização da pele em modelo de hérnia utilizando o laser de baixa potência, porém com potência menor que a utilizada neste trabalho, demonstrando que talvez a utilização de potências menores poderia apresentar resultados diferentes ao nosso.

A alteração da rigidez, apresentada a partir destes resultados estaria relacionada com a proporção de colágeno tipo I e III presentes no tecido e esta seria uma das limitações deste trabalho, onde a quantificação dos tipos de colágeno, tipo I e III poderia nos ajudar a explicar o comportamento de maior deformação no grupo D+L e da melhora na força de tração nos grupos DIC e L3J.

Isto é explicado pela alteração da proporção de colágeno I e III durante a fase de reparo. 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, não só teríamos a necessidade de quantificação do colágeno bem como a investigação do processo de reparo em tempos maiores, por exemplo, 60 e 90 dias após a indução da lesão onde provavelmente, teríamos um cenário diferente destas propriedades mecânicas, principalmente pela alteração da proporção entre colágeno tipo III para tipo I.

Embora a laserterapia apresente um histórico de uso com bons resultados clínicos, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente descrito (PUGLIESE *et al*, 2003; RICH & WHITTAKER, 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). No entanto, 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- CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 de determinadas propriedades mecânicas como a redução da força de tração no instante da ruptura e também a redução da capacidade de deformação do tecido, indicado pela redução do deslocamento.

Os grupos tratados com diclofenaco de sódio ou laserterapia apresentaram melhora na força de tração, porém sem alteração na capacidade de deformação, comparado ao grupo não tratado.

A utilização de terapia farmacológica com diclofenaco de sódio associado a terapia laser na energia de 3J e 100mW não apresentou melhora na força de tração, porém apresentou uma capacidade maior de deformação, indicada pelo aumento do deslocamento neste grupo.

Contudo, outros testes biomecânicos para determinação da elasticidade, bem como a análise da quantificação e direcionamento das fibras colágenas são necessárias para o melhor entendimento deste mecanismo de reparo tecidual.

7. 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. Disponivel 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 Disponivel 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.

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 Fisiología 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.

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, MAGNENET 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, MAGNENET 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 Photobio 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 application. *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 variação da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos:estudo histológico. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomedica) -, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba , São José 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.

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 fibrilar 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 stem/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 THE ASSOCIATION OF LOW INTENSITY LASER AND DICLOFENAC SODIUM IN THE PROCESS OF HEALING IN RAT SKIN.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	EFFECT OF THE ASSOCIATION OF LOW INTENSITY LASER AND DICLOFENAC SODIUM IN THE PROCESS OF HEALING IN RAT SKIN.
Article Type:	Original Article
Keywords:	Scar, Healing, LLLT, Lasertherapy, Mechanical properties, Collagen
Corresponding Author:	Rodrigo Labat Marcos, PhD Universidade Nova de Julho São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Nova de Julho
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Raquel Barbara Maccheronio Dalmaso, Student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Raquel Barbara Maccheronio Dalmaso, Student Rodrigo Alvaro Brandao Lopes-Martins, PhD Romilda Torres-Silva, Master Ernesto Cesar Leal-Junior, PhD Rodney Capp Pallotta, PhD Paulo de Tarso de Carvalho, PhD Rachid Rahouadj, PhD Gilles Arnold, PhD Rodrigo Leal De Paiva Carvalho, PhD 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 to evaluate the effect of low power laser therapy and its association with the anti-inflammatory Diclofenac sodium, in the healing process of rat skin, after induction of a lesion process, morphological and biomechanical aspects were observed. 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 (D/C), scar + 3J laser (L+3J) and scar + 3J laser + diclofenac sodium association (L + D). 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: The NT group showed a reduction of mechanical properties and alterations in histology analysis. Both the DIC and L3J groups showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. The L + D group showed greater deformation when compared to the NT group. We conclude that the use of diclofenac sodium and laser therapy improves certain mechanical properties of skin in this lesion model. The combination of laser therapy with pharmacotherapy seems to change these mechanical properties. 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.

Blinded Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1

2

3

4

Abstract

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

Key-words: Scar, LLLT, Diclofenac, Mechanical properties, healing, collagen.

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

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).

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, epithelialization, 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, innumerable 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

1
2
3
4 laser, the increased expression of type I collagen and the reorganization of these fibers
5 (Oliveira et al, 2009; Fiorio et al, 2014).
6

7 Some studies show evidence about what would be the laser action mechanism in the
8 healing process. There is evidence that the laser can reduce the gene expression of
9 several inflammatory mediators such as PGE2, IL1- β , TNF- α and increase the
10 expression of other anti-inflammatory mediators such as IL-10 (Fukuda et al, 2013;
11 Melo OF Rambo et al, 2014; LIMA AA et al, 2014).
12

13 However, literature regarding the low-level laser therapy in acceleration of wound
14 healing is very controversial, since some of the studies show positive results, while
15 another part shows little or no effect in this repair process. These differences may be
16 related to different protocols used by the authors (Damante et al, 2008).
17

18 It is currently believed that the laser has modulating action on the inflammatory process
19 being able to biostimulate and bioinhibit healing by determining various parameters such
20 as irradiation wavelength, energy density, power density, number of laser applications,
21 treatment time and the tissue to be treated. However, there is still no consensus on the
22 exact dosimetry to be administered for each type of treatment or for each condition or
23 process to be addressed (Lins, 2010; Abreu, 2011).
24

25 Considering the facts presented above, the importance of studies demonstrating the
26 remedial effect of low power laser, and an understanding of its association with drug
27 therapy considered traditional therapy, is a highly relevant factor for the health system.
28 However few study addressing functional and biomechanical aspects of low power laser
29 in the skin healing process.
30

31 2 OBJECTIVES 32 33

34 - Assess the low level laser action (830nm) and its association with drug therapy using
35 diclofenac sodium in tissue repair after induction of skin lesions analyzing the
36 mechanical behavior and histological changes in the skin, 28 days after injury.
37

38 3 MATERIAL AND METHODS 39

40 3.1 Animals 41

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 (L3): Animals with surgical incision by scalpel and treated with laser therapy at a wavelength of 830nm, 3J energy and power of 100mW.

- Laser Association and diclofenac sodium group (L + D): Animals with surgical incision with scalpel and treated with diclofenac sodium (1mg / kg IM) and laser therapy (830nm, 3R, 100mW) respectively. The combined treatment was immediately after the induction into the animal's skin and maintained until the seventh day from the beginning of injury.

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.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

<<figure 1>>

10

3.5 mechanical properties of the skin

11

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.

12

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.

13

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:

14

Maximum Force - (Fmax)

15

Displacement - (Dmax)

16

Stiffness - (a)

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

3.6 Histological Preparation of samples

48

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

61

62

63

64

65

1
2
3
4 stains were used: 1st) hematoxylin and eosin, to enable the visualization of certain
5 structures such as blood vessels, cells, and extracellular matrix, 2nd) picrosirius red for
6 collagen view.
7
8

9 **3.7 Statistical Analysis**
10
11
12

13 Data were presented as mean values with their standard deviations. Both were
14 analyzed in absolute values as their variation in percentage, from the values obtained
15 for the biomechanical analysis. For parametric data, we used ANOVA with post-hoc
16 Tukey-Kramer. The level of significance was set at $p < 0.05$.
17
18

19 **4 RESULTS**
20
21

22 From the experiments, we can plot the following graphs and images below: figure 2
23 shows a graph of the maximum force at the time of rupture of the skin, for the cyclic
24 traction testing. The NT groups, DIC, L3J and D + L showed lower maximum force of
25 traction when compared to the CTL group. Only DIC and L3J groups showed a
26 significant increase of this force at the time of rupture of the tissue.
27
28

29 <<figure 2>>
30
31
32

33 In figure 3 we observe in the graph the maximum displacement obtained for each
34 experimental group during the mechanical traction test. Again, you can see that all the
35 lesioned groups had reduced deformation capacity represented by the displacement in
36 millimeters. Only D + L group showed an increase of these values when compared to
37 the NT
38
39

40 <<figure 3>>
41
42
43

44 The graph of Figure 4 shows the relationship between the maximum traction strength
45 values and their respective time offset at the rupture of the tissue during the traction
46 test. A shift of the injured groups down the control group was observed. The NT group
47 showed an even greater displacement.
48
49

50 <<figure 4>>
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Figure 5 shows the sequence of the various histological groups, healthy and lesioned in different treatments. It can be seen in the first column of the location of the scar (black arrow) in each tissue and the presence of blood vessels (white arrow).

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

<<figure 5>>

5 DISCUSSION

23
24
25
26
27
28
29
30
31

The skin is a complex organ, determining boundaries between internal and external environment, performing various functions related to defense against external agents, thermoregulation, blood flow control and sensorineural action (KHAVKIN & Ellis, 2011; WOOD, 2014). For these reasons, the skin can suffer continuous damaging processes leading to the formation of scar tissue, fibrous characteristic, thereby altering its specific properties (Wood, 2014).

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

This loss of skin integrity present in wounds and scars should be restored immediately to restore homeostasis (Choucair & Phillips, 1997; Li et al, 2005; GREAVES et al, 2013). Thus beginning a healing process that directs the site of lesion to tissue repair. This complex physiological process that aims to restore skin integrity is generally divided into some phases such as hemostasis, inflammatory, granulation tissue formation, re-epithelialization, finishing in tissue remodeling (Choucair & PHILLIPS, 1997; ENOCH & LEAPER, 2005 ; ROLIN et al, 2014).

43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

Being present at the beginning of this process, the inflammatory phase is essential for the direction of repair . At this stage, a variety of intracellular signalling is activated promoting the recruitment of different cell types such as granulocytes and macrophages to the wound site, initiating the formation of scar tissue (SCHREML et al, 2010; GANTWERKER, 2011). Thus, therapies that act in modulating the inflammatory process would be especially important for aiding repair, leading to the formation of a tissue next to the original characteristics.

53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Here we present a model of skin lesion induced by scalpel, an experimental model that resembles the sutures found in surgical procedures. As therapy for promotion this repair, drug therapy by Diclofenac sodium , laser therapy of low power and also the association of these two therapies (pharmacological and laser therapy) was used.

1
2
3

4 The choice of drug is related to earlier work which showed that some anti-inflammatory
5 drugs such as diclofenac sodium, when used in the treatment of wounds, has improved
6 the inflammation in the early days of treatment. However, after 3 weeks of treatment the
7 scar tissue can suffer mechanical changes becoming more fragile, increasing the
8 chances of rupture (QUIRINIA & Viidik, 1997).

9

10 The parameter used for irradiation was 830 nm laser diode, 3J, 100mW and a beam
11 diameter of 0,028cm². These values were carried forward from previous work where
12 we observed the laser action in the modulation of the inflammatory process with
13 improved mechanical properties (Marcos et al, 2014). We also present results showing
14 reduction of certain mechanical properties of the skin on the untreated group (NT),
15 improves these properties in both groups (DIC) and (L3J) and increased deformability in
16 the group which used the laser and drug association.

17

18 Therapy with diclofenac sodium or low-power laser was started immediately after
19 induction of the lesion, and the daily treatment was maintained until the 7th day.
20 Considering the inflammatory phase starts immediately after injury and stays for a few
21 days, the treatment used here probably interfered in the inflammatory phase of the
22 lesion serving as a modulator or inhibitor of the inflammatory process by influencing the
23 repair by laser ability to reduce important inflammatory mediators (MARCOS 2012 and
24 2014).

25

26 The fact that the lesioned tissue presents a significant reduction of its mechanical
27 traction properties also stresses the need to expand the clinical treatment of these types
28 of in order to restore the biomechanical behavior of the skin lesions in the scar site. In
29 this sense, the evaluation of properties is key to understanding its behavior against the
30 damaging process or other events, such as aging or even to know the efficacy of
31 different treatments and therapies (Fung et al, 1999; HOLLANDER et al, 2003).
32 Likewise, the determination of the maximum rupture strength provides the means for
33 understanding and evaluating the quality of the wound and its progression after surgery
34 (CORR et al, 2009).

35

36 In this study, we observed a reduction in traction strength in all groups where the injury
37 was induced, but the DIC and L3J groups showed improvement in these forces when
38 compared to NT.

39

40 Comparing these biomechanical data with histological figures, it was observed that the
41 NT group showed disorganization of the extracellular matrix and collagen changes in
42 intensity, 6C and 6D seen in figures when compared to control group (6A and 6B).

43

44 Still analyzing the histological results, again the DIC and L3J groups showed better
45 organization of matrix and collagen disposition (figures 6E, 6F and 6G, 6H,
46 respectively). The L3J group showed a stronger collagen staining in the scar site.

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

1
2
3

4 Probably this change may influence the tissue stiffness. But it would be necessary to
5 include research in the proportion of collagen I and III to clarify part of this scenario.
6

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Low-level laser therapy has shown to be able to modulate the process of wound healing by stimulating angiogenesis, modulating inflammation by stimulating cell metabolism and cell proliferation (MEDRADO et al, 2008; Cury, 2013). This modulation could be related to the activation of keratinocytes and collagen synthesis promoting not only the resolution of the inflammatory process, but also tissue repair, contributing to the improvement in histological tissue quality (Silva 2013).

17
18
19
20
21
22
23
24

With regard to histological analysis for hematoxylin and eosin staining, we observed the absence of vessels near the lesioned area. In this case the tissue could have a compromised blood supply, essential for proper skin repair. Instead, it was observed the formation of small vessels in close proximity to the region of injury in DIC groups and L3J, which would facilitate the repair for the improvement of this blood supply.

25
26
27
28
29
30

It is known that the laser promotes a shorter inflammatory response accelerating the repair process in the scar (Pereira et al, 2010), by stimulating angiogenesis near the site of injury and increased collagen deposition and this change in tissue matrix reflects in changing the biomechanical behavior (Melo et al, 2011; CORR et al, 2009)

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

During the repair process, are cross-linking of collagen are formed responsible for the hardening of the fibers and change in the mechanical properties of the tissue. These cross-links change with the passage of time and tissue recovery (Frank et al, 1995; PUXKANDL et al, 2002; CORR et al, 2009). In this case, both the drug therapy as laser therapy could stimulate collagen deposition and improve the organizational pattern of these fibers.

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

In examining Figure 6, the relationship between values of maximum force with displacement both at the time of breakage were observed. From this chart, you can draw a line to the control group and observe the angle formed from the beginning of the axis. We can see that the DIC groups and L3J had very close angle to the CTL group, obviously with lower values compared to healthy tissue. We can also see that the D + L group showed a slight decrease of this angle, suggesting a greater deformation capacity. These results may be related to the proportion of collagen type I and III present in the tissue. This would be one of the limitations of our work. The quantification of the types of collagen type I and III could help us explain the greater deformation behavior in group D + L and improvement in traction strength in DIC and L3J groups.

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

This is explained by the change in the proportion of collagen I and III during the repair phase. It is known that during the phase of repair, initially collagen III is synthesized and after some time a part can be directed to collagen type I (MEDRADO et al, 2008). Thus, not only would the need for quantification of collagen as well as the investigation of the

healing process in longer times, e.g., 60 and 90 days after induction of injury which probably would have a different setting these mechanical properties, mainly by altering the ratio of collagen type III to type I.

Although laser therapy presents a history of use with good clinical results, its mechanism of action has not been fully described (PUGLIESE et al, 2003; RICH & WHITTAKER, 2005). its anti-inflammatory effect that directs for tissue repair, promoting improvement in the mechanical properties of tissues is already known (Carvalho et al, 2006; Melo et al, 2011; Marcos et al, 2014). Most clinical studies show the effectiveness of laser therapy in the repair of the skin lesions, but few investigate the histological changes related to modulation of the matrix elements and collagen organization and this number is even smaller when considering compare the histological changes along the mechanical properties of the tissue (Carvalho et al, 2006; Ribeiro et al, 2009). However, more studies are needed to investigate the correlation between the mechanical properties of a tissue with the composition and organization of skin structures.

6 CONCLUSION

From the presented results we can conclude that after 28 days of induction of the lesion by scalpel in rat skin, the untreated group showed a reduction of certain mechanical properties such as reducing traction force at the moment of rupture and also the capacity reduction of tissue deformation, indicated by a reduction in offset. The groups treated with diclofenac sodium or laser therapy showed improvement in traction strength, but no change in deformation capacity, compared to the untreated group. The use of pharmacological therapy with diclofenac sodium associated with laser therapy in energy 3J and 100mW no improvement in traction strength, but showed a greater capacity for deformation, indicated by an increase in displacement in this group.

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

5. REFERENCES:

- 1
2
3
4 ABREU, AC; SOUSA AL; FÔNSECA, CLG; NUNES, JT. Histological analysis of
5 experimental wound healing under the action of low power laser. *Scientia Medica* (Porto
6 Alegre) 2011; v21, n3, p. 96-100.
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
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. Disponivel 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 Disponivel 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.

- 1
2
3
4 CORR DT, GALLANT BEHM CL, SHRIVE NG, HART DA. Biomechanical behavior of
5 scar tissue and uninjured skin in a porcine model. *Wound Repair Regen.* 2009 Mar-
6 Apr;17(2):250-9.
7
8
9
10
11
12 CURY V, MORETTI AI, ASSIS L, BOSSINI P, CRUSCA JDE S, NETO CB, FANGEL R,
13 DE SOUZA HP, HAMBLIN MR, PARIZOTTO NA. Low level laser therapy increases
14 angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and
15 MMP-2. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Aug 5;125:164-70. doi: 10.1016/j.jphotobiol.
16 2013.06.004. Epub 2013 Jun 19.
17
18
19
20
21
22
23
24 DAWOOD MS, SALMAN SD. Low-level diode laser accelerates wound healing. *Lasers*
25 *Med Sci.* 2013 May;28(3):941-5.
26
27
28
29
30 DA SILVA A, LEAL-JUNIOR EC, ALVES AC, RAMBO CS, DOS SANTOS SA, VIEIRA
31 RP, DE CARVALHO PDE T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic
32 rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen
33 types I and III. *J Cosmet Laser Ther.* 2013 Aug;15(4):210-6.
34
35
36
37
38
39 DE MELO RAMBO CS, SILVA JA JR, SERRA AJ, LIGEIRO AP, DE PAULA VIEIRA
40 R, ALBERTINI R, LEAL-JUNIOR EC, DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO P.
41 Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker
42 expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med*
43 *Sci.* 2014; 29(5):1723-33.
44
45
46
47
48
49
50 ENOCH S, LEAPER DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 2005 –
51 Elsevier
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 NEIBURGER EJ. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode
5 laser: a preliminary study. *Gen Dent*. 1997 Mar-Apr;45(2):166-70.
6
7
8
9
10 PEREIRA MCMC, PINHO CB, MEDRADO ARP, ANDRADE ZA, REIS SRA. Influence
11 of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous
12 injuries. *J Photochem Photobiol B*. 2010;98(3):188-92.
13
14 POGREL MA, CHEN JW, ZHANG K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide
15 laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med*. 1997;
16 20(4):426-432.
17
18
19
20
21
22
23
24 PUGLIESE, L.S., MEDRADO, A.P., REIS, S.R.A., ANDRADE, Z.A., The influence of
25 low-level laser therapy on biomodulation of collagen elastic fibers. *Pesqui Odontol*
26 *Bras*. V. 17, n. 14, p.307-313; 2003.
27
28
29
30
31
32 PUXKANDL R, ZIZAK I, PARIS O, KECKES J, TESCH W, BERNSTORFF
33 S, PURSLOW P, FRATZL P. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation
34 investigations and structural model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*
35 *Sci* 2002; 357: 191-7.
36
37
38
39
40
41
42 QUIRINIA A, VIIDIK A. Diclofenac and indomethacin influence the healing of normal
43 and ischaemic incisional wounds in skin. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997
44 Sep;31(3):213-9.
45
46
47
48
49
50 RESENDE, M.A.; PEREIRA, L.S.M.; CASTRO, M.S.A., Proposta de um modelo teórico
51 de intervenção fisioterapêutica no controle da dor e inflamação. *Fisioterapia Brasil*, v. 6,
52 n. 5, p. 368-371, set./out. 2005.
53
54
55
56
57
58 RIBEIRO MA, ALBUQUERQUE RL, RAMALHO LM, BONJARDIM LR, DA CUNHA SS.
59 Immunohistochemical assessment of myofibroblastic and lymphoid cells during wound
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 healing in rats submitted to laser photobiomodulation at 660nm. Photomed Laser Surg.
5 2009;27:49-55.
6
7
8
9
10 RICH L, WHITTAKER P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light
11 assessment of fibrilar hue and spatial distribution. Braz J Morphol Sci. 2005;22:97-104.
12
13
14
15
16 ROCHA JUNIOR, A.M., Low-level laser therapy and wound healing in humans. J Vasc
17 Bras. V. 8, n.3, p. 258-266, 2007.
18
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
30 SAMPAIO, S.A.P, RIVITTI, E.A., Dermatologia. 2 ed. São Paulo: Artes Medicas, 2001.
31 cap. 1 , p. 6-35.
32
33
34
35
36 SCHREML S, SZEIMIES RM, PRANTL L, LANDTHALER M, BABILAS P. Wound
37 healing in the 21st century. J Am Acad Dermatol (PRINT). 2010 Nov;63(5):866-81.
38
39
40
41
42 SILVA EB, MANISCALCO CL, ESPER GVZ, GUERRA RR, KERPPERS II. Analises
43 macro e microscopicas de enxertos cutaneos por semeadura apos laserterapia de
44 baixa intensidade . Rev Col Bras Cir. Disponivel em URL: <http://www.scielo.br/rcbc> [
45 periodoico na internet] 2013; 40(1).
46
47
48
49
50
51
52 VAN BREUGEL HH, BÄR P. Power density and exposure time of He-Ne laser
53 irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human
54 fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med. 1992;12(5):528-537.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65