

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

ELIANE MARTINS AMADIO

**ANÁLISE DA AÇÃO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO NO REPARO
DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS EM RATOS
DESNUTRIDOS**

São Paulo
2019

ELIANE MARTINS AMADIO

**ANÁLISE DA AÇÃO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO NO REPARO
DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS EM RATOS
DESNUTRIDOS**

Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho para obtenção do título de Doutora em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Dr. Paulo de Tarso
Camillo de Carvalho.

São Paulo

2019

Azriadio, Eliane Martins.

Análise da ação da fotobioestimulação no reparo de feridas cutâneas induzidas em ratos desnutridos. / Eliane *Martins* Amadio. 2019. 93 f.

Dissertação (Mestrado)— Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camilo de Carvalho.

1. Cicatrização de feridas.
2. Terapia por fotobiomodulação.
3. Metaloproteinases.
4. Resistência mecânica.
5. Colágeno.
6. Desnutrição proteica.

L. Carvalho, Paulo de Tarso Camilo de. II. Título

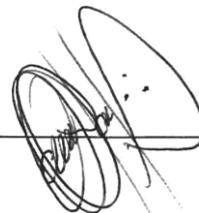
São Paulo, 27 de junho de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Eliane Martins Amadio

Titulo da Tese: 'Análise da ação da fotobiomodulação na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em ratos desnutridos'

Presidente: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



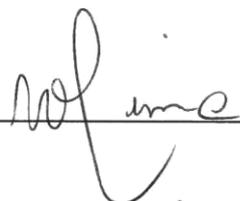
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. MARIO DE OLIVEIRA LIMA



Membro: PROF. DR. LUCIANA MARIA MALOS/ SAMPAIO JORGE



“Dedico esse trabalho aos meus pais Jose Antonio Amadio e Dirce Martins Amadio (in memorian), que todos os dias me deram forças para superar as dificuldades e persistir no sonho. Obrigado (a) por fazerem o possível e o impossível por mim, com todo amor do mundo”.

– “Dedico esse trabalho ao meu orientador Paulo de Tarso Camilo de Carvalho que me aceitou como aluna, me orientou e mesmo também passando por dias difíceis não deixou de se preocupar e trabalhar arduamente para que esta pesquisa fosse realizada”.

- *“Agradeço ao Professor Rodrigo Labat, pelos ensinamentos no teste de tração.”*
- *“Agradeço às amigas Solange A. Santos e Jhaiza pela grande ajuda no momento da pesquisa laboratorial, realizando cálculos de medicamentos, confecções das lesões e eutanásia dos animais”*
- *“Agradeço à Equipe de Professores do Programa de Biofotônica da Universidade Nove de Julho que ao longo destes anos estiveram em meu caminho me apoiando e me ensinando.”*
 - *“Agradeço [às funcionárias do Biotério e do Laboratório de Pesquisa da Biofotônica que sempre foram acolhedores em minhas dificuldades e necessidades.”*

SUMÁRIO

RESUMO	23
ABSTRACT.....	24
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	25
LISTA DE FIGURAS.....	27
LISTA DE QUADROS E TABELAS	31
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	36
2.1 Desnutrição	36
2.2 Cicatrização.....	38
2.2.1 Fase Inflamatória.....	40
2.2.2 Fase Proliferativa	42
2.2.3 Fase de Remodelamento	43
2.3 Cicatrização em Desnutridos	44
2.4 Terapia por Photobiomodulação	47
2.5 Cicatrização e Fotobiomodulação por Laser	50
2.6 Colágeno e Propriedades Mecânicas da Pele.....	52
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Amostra.....	55
4.2 Aspectos Éticos.....	55
4.3 Dieta.....	55
4.4 Protocolo de Desnutrição	56
4.5 Grupos Experimentais.....	56
4.6 Confeção das Lesões Cutâneas Experimentais.....	57

4.7 Terapia por Fotobiomodulação.....	58
4.8 Eutanásia	58
4.9 Procedimentos Histológicos e Quantificação	59
4.10 Teste de Propriedades Mecânicas da Pele.....	61
4.11 Propriedades Mecânicas da Pele.....	63
4.12 Imuno-histoquímica	64
4.13 Análise Estatística	66
5 RESULTADOS	67
5.1 Picrosirius Red - Colágeno tipo I.....	67
5.2 Picrosirius Red - Colágeno tipo III	68
5.3 Propriedades Mecânicas da Pele	72
5.4 Metaloproteinases de Matriz - 3 (MMP-3)	78
5.5 Metaloproteinases de Matriz - 9 (MMP-9)	82
6 DISCUSSÃO.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

RESUMO

A terapia por fotobiomodulação (PBMT) tem sido indicada para a cicatrização de feridas por poduzir aumento na atividade mitótica, número de fibroblastos, síntese de colágeno e neovascularização, no entanto em condição desfavorável tal como a desnutrição proteica a fotobiomodulação ainda não foi completamente estudada. Diante do exposto este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da PBMT na cicatrização na fase de proliferação em ratos submetidos a dieta hipoproteica. Para tanto, foram utilizados 40 ratos, machos com 12 semanas, foram 20 submetidos a dieta normoproteica a 25% e 20 submetidos a dieta hipoproteica a 8%. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=10), e submetidos à ferida cutânea por meio de punch de 8 mm. Um grupo normoproteico e um grupo hipoproteico foram tratados por fotobiomodulação por laser de baixa intensidade (660nm, 50 mW , 1.07 W/cm² , 0.028 cm² , 72 J/ cm², 2 J), enquanto os outros dois grupos não passaram por este procedimento. Foram realizadas as seguintes análises aos 7 e aos 14 dias do processo de reparação tecidual: análise histopatológica semi-quantitativa; diferenciação do porcentual de colágeno tipo I e III por polarização das lâminas histológicas coradas por *picrosirius red* e marcação por imunohistoquímica de MMP-3, MMP-9 fibronectina e VEGF; e teste de resistência mecânica em máquina universal de ensaio. Os resultados mostraram que houveram diferenças significativas entre os grupos normoproteico tratados e não tratados $p < 0.05$, bem como em relação aos grupos hipoproteicos tratados e não tratados $p < 0.001$ na análise histopatológica semi-quantitativa e a imunohistoquímica para as metaloproteinases 3 e 9 demonstrou que a PBMT foi capaz de diminuir a imunomarcação com diferença estatística de $p < 0.01$. Houve também diminuição do processo de deposição do colágeno com diferença estatística de $p < 0.05$ tanto para colágeno do tipo I como III. Podemos concluir que a terapia fotobiomodulação por laser de baixa intensidade se mostrou eficaz no tratamento de feridas cutâneas em animais submetidos a dieta hipoproteica , em diferentes fases do processo de reparação tecidual, porém estas alterações se mostraram mais marcantes na fase de proliferação com aumento da formação de vasos sanguíneos e tecido de granulação, além de diminuição das metaloproteinases proporcionando melhor resistência mecânica da área lesionada na fase de remodelamento com intensificação do colágeno tipo I.

Palavras-Chave: Cicatrização de feridas; terapia por fotobiomodulação; metaloproteinases; resistência mecânica; colágeno; desnutrição proteica.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy (PBMT) has been indicated for wound healing through increased mitotic activity, number of fibroblasts, collagen synthesis and neovascularization; however, in unfavorable conditions such as protein malnutrition, photobiomodulation has not yet been fully studied. In view of the above, this study aimed to verify the effects of PBMT on healing in the proliferation phase in rats submitted to a hypoproteic diet. For this purpose 40 male rats (12 weeks) were used, of which 20 were normoproteic (25%) and 20 were submitted to 8% hypoproteic diet. The animals were divided into four experimental groups (n = 10) and submitted to cutaneous wound by means of 8 mm punch and treated by low intensity laser photobiomodulation (660 nm, 50 mW, 1.07 W / cm², 0.028 cm², 72 J / cm², 2 J). The following analyzes were performed at the 7 and 14 days of the tissue repair process: semi-quantitative histopathological analysis (H&E), differentiation of the type I and III collagen I percentage by polarization of histological laminae stained with *picrosirus red* and labeling by immunohistochemistry of MMP- 3, MMP- 9 fibronectin and VEGF and test of mechanical resistance in machine universal test. . The results showed that there were significant differences between the normoproteic groups with lesion and their respective groups treated p <0.05, as well as for the treated and untreated hypoproteic groups p <0.001 in the semi-quantitative histopathological analysis and immunohistochemistry for the metalloproteinases 3 and 9 demonstrated that PBMT was able to decrease the immunostaining marking with statistical difference of p <0.01. There was also a decrease in the collagen deposition process with a statistical difference of p <0.05 for both types III collagen and I. We can conclude that low intensity laser photobiomodulation was effective in the treatment of cutaneous wounds in animals submitted to a hypoproteic diet, at different stages of the tissue repair process, but these alterations were more marked in the proliferation phase with increased formation of blood vessels and granulation tissue, as well as decreased metalloproteinases, providing better mechanical resistance of the injured area in the remodeling phase with type I collagen interest.

Keywords: Wound healing; photobiomodulation therapy metalloproteinases, mechanical resistance, collagen, protein malnutrition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ams	Moléculas de Adesão
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CCO	Citocromo C Oxidase
CK	Creatina Quinase
CRP	Proteína C-reativa
CTAP III	Peptídeo ativador do tecido conjuntivo III
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2 (PGE2)	Prostaglandina natural <i>E2</i>
ERK SP1	Fator de Transcrição Sp1
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FGF b	Fator de Crescimento de Fibroblastos beta
FGFR	Receptor de fator de Crescimento de Fibroblastos
FGFR-1	Receptor de fator de Crescimento de Fibroblastos
GH	Hormônio de Crescimento
GRO-alfa	Oncogênese regulado pelo crescimento - alfa
IGFBP3	Proteína ligadora-3 do fator de crescimento
IKK	Via de Sinalização de NF-KB
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Síntese Induzível de Óxido Nítrico
InGaAlP	FosfetoÍndio-Gálio-Alumínio
IL-8	Interleucina – 8
IL-10	Interleucina – 10
LDL	Densidade lipoproteica
LDH	Lactato desidrogenase
LDHA	Lactato desidrogenase A
J	Joule
PBMT	Terapia por Fotobiomodulação
mRNA	RNA Mensageiro
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF-kB	Fator nuclear kappa B
mW	Milliwatts
mmP2	Matriz metalloproteinase-3
mmP9	Matriz metalloproteinase-9

nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
TNF- alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Time course</i> do processo de cicatrização normal e suas 3 fases: inflamatória, proliferação e remodelamento.	26
Figura 2.	Ilustração demonstrando as fases do processo de cicatrização de feridas cutâneas.	29
Figura 3.	Distribuição dos grupos e subgrupos experimentais.	43
Figura 4.	Imagem ilustrativa da tela do programa Image-Pro plus 4.5 utilizado na quantificação do colágeno tipo I e III.	46
Figura 5.	Imagem ilustrativa da utilização da ferramenta de macro do Image-Pro plus 4.5, na segmentação do colágeno.	47
Figura 6.	Representação esquemática de uma máquina universal de ensaio.	48
Figura 7.	Ilustração da execução do teste de resistência mecânica das feridas cutâneas realizadas na máquina universal de ensaio.	49
Figura 8.	Gráfico do ensaio de Tração: Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento.	50
Figura 9.	Imagem ilustrativa da quantificação das áreas imunomarcadas após o procedimento de imuno-histoquímica utilizando o programa Image-Pro plus 4.5.	52
Figura 10.	Imagens representativa obtidas por meio de cortes histológicos corados com picrosirus red e visulados em microscópio com luz polarizada o que permitiu a contagem do porcentual de de colágeno tipo III e I, bem como o entrelaçamento aos 7 e 14 dias após a lesão experimental nos grupos normoproteico, hipoproteica, normoproteica PBMT, hipoproteicaa PBMT. x 40. Barra de escala = 20 µm.	55
Figura 11.	Representação da análise do percetual de colágeno tipo I aos 7 dias após a confeção das lesão cutâneas, comparando dos grupos: grupo de normoproteico; grupo de hipotroteico; grupo normoproteica PBMT; grupo hipotroteíca PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparao com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P na comparação entre os grupos normoproteico	56

PBMT e hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

- Figura 12. Representação da análise do percentual de colágeno tipo I aos 14 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo de normoproteica; Grupo hipoproteico; Grupo normoproteico PBMT; grupo hipoproteico PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, $\Phi \Phi$ P <0,01, $\Phi \Phi \Phi$ P, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 56
- Figura 13. Representação da análise do percentual de colágeno tipo III aos 7 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipoproteico; grupo normoproteico PBMT; grupo hipoproteico PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, $\Phi \Phi$ P <0,01, $\Phi \Phi \Phi$ P na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 57
- Figura 14. Representação da análise do percentual de colágeno tipo III aos 14 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipoproteico; grupo normoproteico PBMT; Grupo hipoproteico PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico lesão ; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, $\Phi \Phi$ P <0,01, $\Phi \Phi \Phi$ P na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 57
- Figura 15. Comparação da Força máxima (Fmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de força máxima 7 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; Φ P <0,05, $\Phi \Phi$ P <0,01, $\Phi \Phi \Phi$ P <0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 59

- Figura 16. Comparação da Força máxima (Fmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de força máxima 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P<0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 60
- Figura 17. Comparação da Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de Dmax 7 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P<0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 61
- Figura 18. Comparação da Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P<0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. 62
- Figura 19. Comparação da relação entre Força máxima x Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Fmax x Dmax 7 dias após a confecção das lesões. Em B valores de Fmax x Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). 63
- Figura 20. Comparação da relação entre Força máxima x Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Fmax x Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). 63

- Figura 21. Comparação da espessura da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos. Dados apresentados em média e desvio padrão. Média das variâncias Test F, *p,0,05. 64
- Figura 22. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-3 aos 7 dias após a confecção das lesão cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipotroteica; grupo normoproteico PBMT; grupo hipotroteico PBMT. * p< 0,05; *** p <0,001 para comparação com normoproteico; ## p <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico; Φ Φ p <0,01, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). 65
- Figura 23. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-3 aos 14 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipotroteica; grupo normoproteica PBMT; grupo hipotroteica PBMT. ** p< 0,01; *** p <0,001 para comparação com normoproteico; ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ Φ Φ p <0,001, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). 66
- Figura 24. Representação das fotomicrografias obtidas dos cortes histológicos e submetidos à técnica de imuno-histoquímica para MMP-3, obtidas aos 7 e 14 dias após a confecção das lesões cutâneas em ratos normoproteicos e hipoproteicos tratados ou não com PBMT. Observar as áreas marcadas positivamente em marroz escuro, aumento de 40x. 67
- Figura 25. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-9 aos 7 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipotroteica; grupo normoproteico PBMT; grupo hipotroteico PBMT. *** p <0,001 para comparação com normoproteico; ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). 68
- Figura 26. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-9 aos 14 dias após a confecção das lesão cutaneas, comparando dos grupos: grupo normoproteica; grupo hipotroteica; grupo normoproteica PBMT; 69

grupo hipotroteica PBMT. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparação com normoproteico; ### $P < 0.001$ para comparação com o grupo hipoproteico; $\Phi \Phi \Phi p < 0,001$, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

Figura 27. Representação das fotomicrografias obtidas dos cortes 70
histológicos e submetidos à técnica de imuno-histoquímica para
MMP-9, obtidas aos 7 e 14 dias após a confecção das lesões
cutaneas em ratos normoproteicos e hipoproteicos tratados ou
não com PBMT. Observar as area marcadas positivamente em
marroz escuro, aumento de 40x.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Composição da dieta hipoproteica.....	42
Tabela 1. Parâmetros do Laser	44

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização consiste na reconstituição tecidual que envolve uma série de eventos integrados e divididos em fases distintas e sequenciais, Elas são: fase inflamatória; fase proliferativa com formação de tecido de granulação e a composição da matriz extracelular depositando colágeno, elastina e fibras reticulares; e por último a fase de remodelamento ^{(1) (2)}

Na fase inflamatória ocorre a hemostasia no local da ferida com a migração de leucócitos, neutrófilos e a infiltração de monócitos que irão se diferenciar em macrófagos, que além de eliminar tecido morto e bactérias presentes no leito da lesão, serão responsáveis por produzirem diversos fatores de crescimento tais como, fator de crescimento dos fibroblastos e fator de crescimento endotelial vascular ⁽³⁾.

A fase proliferativa é caracterizada pela migração de fibroblastos ⁽⁴⁾, deposição de colágeno ⁽³⁾ e a formação de novos vasos, sendo a angiogênese o fenômeno mais evidenciado nesta fase ⁽⁵⁾.

A última e terceira fase do processo de cicatrização é o remodelamento constituída da mudança do tipo de colágeno que passarão a serem dispostos em linhas para se contraírem e fortalecerem o tecido epitelial ⁽⁴⁾

Este processo cicatricial descrito refere-se ao reparo de uma lesão onde as etapas relativamente não sofrem interferência de algum processo crônico para o cumprimento da quimiotaxia celular até seu remodelamento, ou seja, ocorre em um prazo de aproximadamente 21 dias, porém quando o organismo acometido por fatores como doenças cardiovasculares, diabetes, desnutrição e envelhecimento, este processo apresenta dificuldades em reestabelecer o tecido perdido, tornando-o mais complexo e longo ⁽⁶⁾.

As complicações decorrentes no processo de cicatrização podem ser determinadas por vários fatores, tanto intracorpóreos quanto extracorpóreos e acarretam em retardo no processo quimiotático das etapas do reparo teciduais, sendo então comprometida desde a defesa na fase inflamatória com a produção de leucócitos, neutrófilos e macrófagos até a fase do remodelamento com a redução da produção de colágeno ⁽⁵⁾.

Por consequência à estas mudanças ocorre a diminuição da microcirculação local e da resposta imunitária, aumentando o risco de danos às estruturas adjacentes, pois o fornecimento de nutrientes para a pele fica diminuído reduzindo também a permeabilidade transdérmica ⁽⁷⁾.

A desnutrição é um dos aspectos que contribuem para o agravamento do processo de cicatrização, pois nutrientes tais como vitamina D, cálcio, potássio, ferro apresentam-se em concentrações diminuídas agravando o aporte necessário nas células da cascata de cicatrização ⁽⁸⁾.

Deficiências dietéticas prejudicam o processo de cicatrização de feridas tais como: a vitamina C que são necessárias na síntese de colágeno e na produção de N-acetil galactosamina, um componente de matriz e tecido de granulação; diminuição do magnésio que é necessário na síntese de proteínas; deficiência em zinco que compromete a função das metaloproteínas imprescindíveis na fase de remodelamento com a deposição de colágeno tipo I ⁽⁹⁾.

Apesar das deficiências nutricionais não serem o único parâmetro para avaliar o retardo no processo de reparo tecidual, estudos demonstram que quando esta deficiência é suprida há uma melhora considerada neste processo, porém muitas vezes as intervenções para sua correção não são possíveis ou não apresentam os efeitos necessários ⁽¹⁰⁾.

As novas tecnologias podem oferecer uma alternativa para melhorar o processo de cura de lesões em organismo desnutrido e dentre elas destaca-se a utilização da irradiação de luz, através de um mecanismo conhecido fotobiomodulação, anteriormente representada na literatura pelo termo laserterapia em baixa intensidade ⁽¹¹⁾.

Os efeitos biológicos da fotobiomodulação sobre os tecidos apresentam reações estimulantes e inibitórias que podem ser explicadas pela interação do tecido biológico com determinado comprimento de onda que é absorvido pela célula através de cromóforos celulares específicos que são transformados em energia e utilizados no metabolismo celular ⁽¹²⁾.

Estudos demonstram que a fotobiomodulação produz um aumento na proliferação celular ⁽¹³⁾, aumento da produção mitótica celular onde a irradiação proporciona elevação nos íons de cálcio no citoplasma celular acelerando o

processo de divisão, da síntese de proteínas e citocinas e também melhorando a circulação sanguínea ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁵⁾.

O aumento na produção de colágeno, a diminuição do stress oxidativo, sugere que o tratamento com a fotobiomodulação poderá oferecer uma alternativa na cicatrização de feridas ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ aumentando também a indução da atividade da catalase, gerando maior quantidade de espécies reativas de oxigênio e níveis de queratinócitos ⁽¹⁷⁾.

O tratamento com esta tecnologia poderá auxiliar na quimiotaxia celular oferecendo um suporte a seus componentes nas respectivas fases aguda e proliferativa do reparo tecidual, podendo equilibrar o processo de cicatrização deste tecido que se encontra com camadas epiteliais estreitadas e vascularização reduzida.

Como observado, na literatura inúmeros trabalhos apresentam resultados que favorecem o processo cicatricial, porém há poucas análises observando o tratamento com a fotobiomodulação de lesão em tecido desnutrido.

A proposta deste estudo consiste em avaliar o resultado no tratamento em organismo desnutrido através da fotobiomodulação, tendo em vista a importância em oferecer a estes indivíduos a possibilidade de tratamento com uma tecnologia que poderá melhorar os processos cicatriciais, podendo até mesmo reduzir o tempo de cura de uma lesão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desnutrição

A desnutrição é uma condição patológica do desequilíbrio nutricional devido à ingestão insuficiente de calorias, proteínas, vitaminas, sais minerais e nutrientes gerais. A falta de ingestão de proteínas afeta o crescimento e a regeneração das células ⁽¹⁸⁾. Em crianças, a desnutrição protéica retarda o crescimento físico e o desenvolvimento metabólico, o que persiste mesmo após o retorno ao estado nutricional saudável ao longo da vida ^{(19) (20)}.

A desnutrição é desencadeada por deficiência na alimentação e este fator contribui para um atraso no processo de cicatrização. O estado nutricional aumenta o risco de complicações em processos operatórios como fraturas ósseas, apresentando um retardo na cicatrização, sendo necessária maior intervenção de cuidados para diminuir o risco em desenvolver complicações ⁽⁸⁾.

O número de pessoas subnutridas no mundo é extremamente alto e atingiu quase 1 bilhão de pessoas em 2010. A desnutrição nos países em desenvolvimento tem sido atribuída principalmente à uma dieta com baixa proteína ^{(19) (21)} ou baixa qualidade dos alimentos consumidos ⁽²¹⁾.

No reino unido quando avaliado os parâmetros nutricionais de 290 pacientes institucionalizados concluiu-se que 37% dos pacientes com mais de 65 anos de idade estavam em estado de desnutrição onde foram encontradas diferença significativa nos níveis de hemoglobina, de baixa densidade lipoproteína (LDL), na lipoproteína de alta densidade, no níveis de colesterol, triglicérides, albumina e proteína, peso e índice de massa corporal (IMC); e de outros 31% dos pacientes estavam em risco de desnutrição havendo diferença significativa nos níveis de LDL, do colesterol, de albumina, das proteínas, do peso e do IMC chegando-se a conclusão de que o risco de desnutrição para pacientes internados é alta, necessitando de uma rigorosa triagem nutricional na prestação de cuidados aos pacientes institucionalizados em reabilitação ⁽²²⁾.

Segundo as Nações Unidas, nos países sub-desenvolvidos, aproximadamente um terço das pessoas possui algum tipo de deficiência em vitamínica ou mineral⁽²³⁾, e um quarto das crianças em idade pré escolar (27%)

sofre de desnutrição, o que equivale a mais de 143 milhões de pessoas (24).

No entanto, há um contraste com os efeitos sobre a desnutrição no sistema imunológico, onde as pessoas desnutridas parecem ser muito mais susceptíveis aos efeitos deletérios das doenças infecciosas.

A resposta a um grau menos severo de restrição alimentar também pode ser vista como uma série de processos adaptativos com as mesmas prioridades, ou seja, manter o fornecimento de glicose ao cérebro e minimizar a perda de tecido magro. Quando isto ocorre, a taxa metabólica basal diminui para minimizar o balanço energético negativo. Isto ocorre em parte pela perda de tecido metabolicamente ativo, mas há também algumas evidências de que a eficiência do metabolismo energético aumenta, levando a uma diminuição no gasto de energia por unidade de massa celular (25).

Segundo estudo este balanço na taxa metabólica pode ocorrer para que haja um aumento da eficiência do acoplamento da produção de ATP evitando o vazamento de prótons mitocondriais. Também pode haver alguma redução na rotatividade de proteínas e na atividade da ATPase de sódio e potássio, que são os processos que respondem pela maioria do gasto energético basal (25).

A longo prazo, no entanto, o principal mecanismo pelo qual o gasto energético é minimizado é pela perda progressiva de tecido metabolicamente ativo. Assim, por exemplo, como em um experimento realizado na universidade de Minnesota (26). após 168 dias, a taxa metabólica havia diminuído em 37% quando expressa em kcal/dia, mas em apenas 15% quando expressa em kcal /dia por unidade de massa de tecido ativa.

Há evidências que a adaptação do metabolismo energético em pessoas que vivem suas vidas com ingestão de alimentos inadequados pode ser um pouco diferente da resposta de indivíduos previamente bem nutridos em um período de subalimentação. A principal resposta em populações cronicamente desnutridas é a baixa taxa de crescimento, a maturidade tardia e a pequena estatura adulta. A pequena estatura pode ser vista como uma adaptação bem-sucedida à ingestão de baixa energia, porque a taxa metabólica basal geral será baixa. No entanto, quando a taxa metabólica é

ajustada para massa livre de gordura, não há diferença significativa entre aqueles que são mais desnutridos e aqueles que são bem nutridos ⁽²⁷⁾.

A razão para isso é que o principal déficit na massa de tecido magro está nos músculos, que têm uma taxa metabólica relativamente baixa, enquanto o tamanho dos órgãos viscerais, que são muito mais metabolicamente ativos, é muito menos afetado ⁽²⁸⁾. Portanto, essas mudanças na composição corporal podem anular qualquer aumento na eficiência do metabolismo celular.

Quanto a produção proteica a desnutrição pode alterar a característica e a quantidade das fibras de colágeno ⁽²⁹⁾. Até agora, foram descobertos 28 tipos de colágeno, dos quais o tipo I representa 90% do total de colágeno no corpo humano e é o principal componente da parte orgânica dos ossos. Uma proteína de colágeno tipo 1 normal consiste nas chamadas cadeias de colágeno alfa-1 tipo I e cadeias de colágeno alfa-2 tipo 1 que formam uma molécula de pró-colágeno tipo I. Extracelularmente, essas moléculas são processadas e organizadas em fibrilas finas com a capacidade de reticulação entre si, resultando em fibras de colágeno maduras. Essas fibras de colágeno maduras exibem tridimensionalmente uma estrutura tripla helicoidal, que impede a decomposição do colágeno pelas enzimas, contribuindo para a adesividade das células e a formação da matriz extracelular ⁽³⁰⁾.

A formação de fibras colágenas anormais e irregulares pode ser o resultado de uma deficiência de vitamina C.

Com este processo desencadeado pela desnutrição, a presença de fibras irregulares resultará em uma cicatrização demorada. ⁽³¹⁾.

2.2 Cicatrização

A cicatrização é o processo pelo qual o organismo procura reparar uma lesão ou perda de tecidos. Este processo se inicia imediatamente após a perda de tecidos com a finalidade de substituí-los.

O processo de cicatrização ocorre em três fases: inflamação, formação de tecido de granulação e remodelamento. Os eventos celulares e

tissulares de cada uma dessas fases envolvem mediadores químicos que estão justapostos e correlacionados entre si ⁽³²⁾ ⁽⁴⁾.(Figura 1.)

Após danos tissulares inicia-se imediatamente uma série de eventos desencadeados por estímulos físicos e químicos provenientes de mediadores das células rompidas, sendo estes provocados por fragmentos de elementos inertes aos tecidos, proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos por ação dos mediadores inflamatórios. Essas moléculas se ligam a receptores localizados na superfície da membrana de células adjacentes induzindo modificações em seu metabolismo que, em resposta ativam os mediadores lipídicos, os eicosanoides, e os peptídicos, as citocinas, os fatores de crescimento e os neuropeptídeos, ocorrendo ainda a saída de proteínas de adesão para leucócitos da superfície da membrana ⁽⁴⁾ ⁽³³⁾.

As células locais, ativadas, serão as protagonistas da fibroplasia e da deposição da matriz extracelular, da angiogênese, da cicatrização e da reepitelização da região da ferida ⁽⁴⁾ ⁽³⁴⁾.

O reparo completo ocorre após eventos alternados de sucessivas reações, tendo os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, conhecidas por suas atividades imuneológicas estão envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação de tecidos e pela produção de fatores de crescimento ⁽⁵⁾.

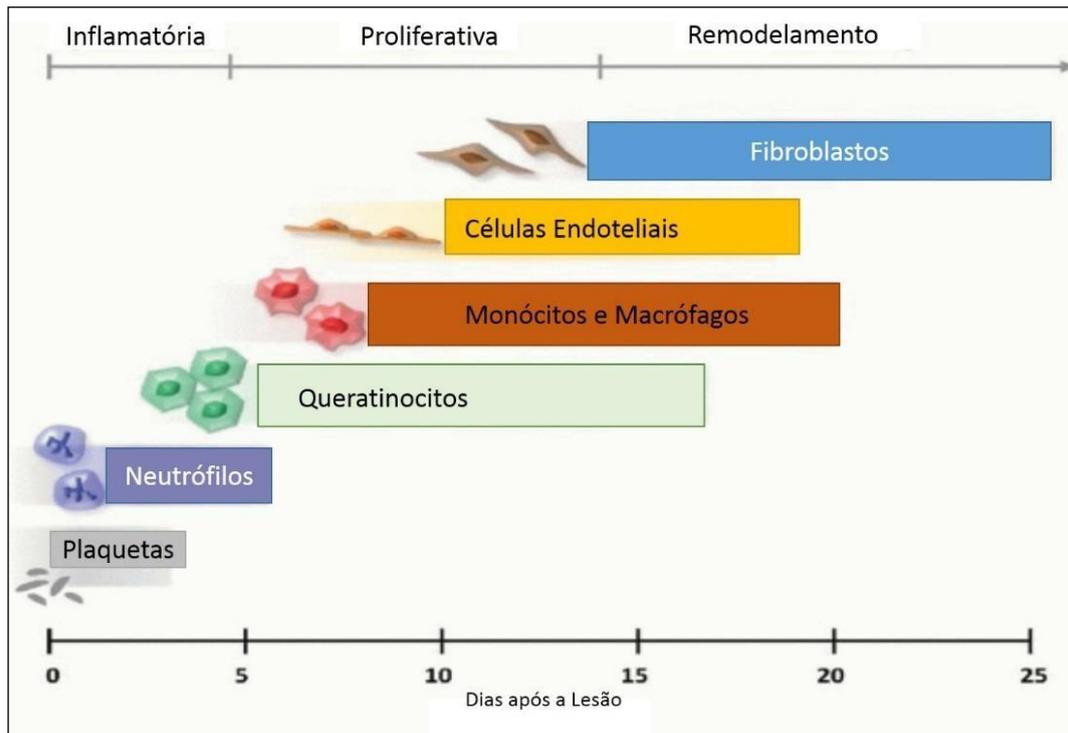


Figura 1. *Time course* do processo de cicatrização normal e suas 3 fases: inflamatória, proliferação e remodelamento. Adaptado: Phases Of Wound Heal <https://www.clinimed.co.uk/wound-care/wound-essentials/phases-of-wound-healing>.

2.2.1 Fase Inflamatória

A fase inflamatória tem início imediatamente após o trauma. Os eventos que ocorrem nesta fase têm por objetivos principais, a remoção de tecidos desvitalizados, a ativação dos mecanismos de defesa locais e a regulação de sinais adequados para a continuidade das fases subsequentes (35).

Após o trauma e o conseqüente extravasamento de sangue dos vasos locais, inicia-se a deposição de plaquetas que posteriormente recrutam novas plaquetas com a finalidade homeostática, formando um trombo que temporariamente proporciona o tamponamento destas lesões endoteliais (36) (35). Esta agregação de plaquetas e seu entrelaçamento apresentam uma rede de fibrina que é conseqüência da ação da trombina sobre o fibrinogênio circulante e que além da função homeostática irá promover uma matriz extra celular onde se deslocarão e se fixarão células inflamatórias, fibroblastos e fatores de crescimento (8) (35).

As plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas como colágeno subendotelial exposto na ruptura dos vasos, a trombina gerada pelo processo de coagulação ⁽³⁶⁾ e pelo ADP liberado da hemácias Willebrand ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾. Quando ativadas, as plaquetas liberam fatores de crescimento como o TGF- β e o PDGF, quimiocinas como o CTAPIII e também outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina que são encontradas em seus grânulos. A interação destas proteínas dos grânulos com as proteínas presentes na matriz extra celular juntamente com a massa de corpos plaquetários formam a matriz provisória, que irá orientar a migração das células envolvidas com a resposta inflamatória ⁽³⁸⁾.

As primeiras células inflamatórias a adentrar a lesão são os neutrófilos que exercem a ação de limpeza do local, com remoção de tecido lesado, partículas exógenas e bactérias; e a liberação de mediadores, principalmente interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF) para amplificar o processo e atrair mais células inflamatórias ⁽³⁸⁾.

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue eles migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾. Ao final de um dia após a lesão eles constituirão 50% das células migradas para o local da lesão ⁽⁴⁰⁾.

No Interior das células a concentração de mediadores liberados são ativados e passam a secretar outros mediadores como GRO-alfa que promoverão o processo de diapedese ou regulação da produção de neutrófilos ⁽⁴¹⁾.

As células que em seguida comparecem são os macrófagos derivados de neutrófilos que se diferenciaram. Eles são atraídos por trombina, sistema complemento, PDGF e TGF alfa e TGF beta e além de sua função fagocitária e manutenção do processo inflamatório local, desempenham papel importante no processo de cicatrização ao produzirem diversas citocinas e fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, a produção de colágeno, a reepitelização ⁽³³⁾ ⁽⁸⁾.

Com a presença do macrófago, a migração de fibroblastos é intensificada e inicia um processo de multiplicação de fibroblastos que migra

das margens para o centro da lesão. Neste momento a matriz celular provisória começa a ser substituída por um tecido conjuntivo ⁽³⁹⁾. (Figura 2.)

2.2.2 Fase proliferativa

Nesta etapa conhecida como proliferativa a presença de macrófagos derivados de monócitos intensifica a migração e ativação de fibroblastos que são os principais componentes do tecido de granulação. Com o aumento do número de fibroblastos ativados aumenta a produção de colágeno no local e como consequência a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico, processo este conhecido como fibroplasia. Para que ocorra esta fibroplasia em paralelo deve acontecer a formação de novos vasos sanguíneos ⁽⁴²⁾, formando então o tecido de granulação por volta do quinto dia ⁽¹²⁾. Este tecido é edematoso, composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, caracterizado pela presença de tecidos imaturos com muitos espaços vazios e que sangram com facilidade ⁽⁴³⁾.

Estes tecidos imaturos nada mais são do que extremidades rombas de vasos neoformados e para serem fortalecidos inicia-se então a neovascularização ⁽⁴³⁾, onde os vasos intactos presentes nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador de plasminogênio promovendo aberturas na membrana basal e permitindo a migração de células endoteliais. As células endoteliais migratórias uma vez no exterior dos vasos formam um broto capilar que se ligam ao capilar de onde originaram restabelecendo a ligação do tecido e o fluxo sanguíneo ⁽³⁴⁾.

Apesar dos espaços anteriormente vazios estarem sendo preenchidos por tecido de granulação, ocorre neste momento a diferenciação de alguns fibroblastos em miofibroblastos, que apresentam uma característica de contração movendo-se uma em direção à outra borda, em um fenômeno invisível de atração ⁽³²⁾. (Figura 2.)

Os fibroblastos então passam a depositar grandes quantidades de fibronectina que auxiliam na fixação da célula. Os fibroblastos neste momento deixam de ter a característica de células imaturas e adquirem um fenótipo de células engajadas na síntese protéica, tendo então seu citoplasma volumoso apresentando um retículo endoplasmático rugoso abundante que secreta

bastante colágeno que aos poucos vão substituindo os proteoglicanos e a fibronectina ⁽⁴⁴⁾.

Ao final desta etapa o tecido de granulação preencheu totalmente o leito da ferida e a circulação foi restabelecida pela neovascularização e mais fibras de colágeno que comparecem neste momento passam a dar ao tecido a aparência de cicatriz ⁽³²⁾. (Figura 2.)

2.2.3 Fase de Remodelamento

Após o preenchimento do leito da ferida pelo tecido de granulação ⁽¹⁴⁾ inicia-se a fase de remodelamento que envolve sucessivas etapas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno ⁽³²⁾.

O principal agente desse remodelamento é o fibroblasto produzido na fase pruriferativa proliferativa que além do papel como produtor de colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos é produtor também de metaloproteinases ⁽⁴⁵⁾ ⁽³⁵⁾ enzimas responsáveis pela degradação da quantidade excessiva de colágeno presente no leito da lesão para que a cicatrização e a repitelização ocorra de forma equilibrada ⁽³⁵⁾ ⁽³³⁾.

O colágeno tipo III é o mais abundante e ele vai sendo degradado enquanto o colágeno tipo I tem sua produção aumentada estimulado pelos fibroblastos, ocorrendo juntamente com este fenômeno uma mudança nas fibras de colágeno e em seu entrelaçamento que passarão a serem dispostos em linhas para se contraírem e fortalecerem o tecido epitelial ⁽⁴⁾. (Figura2.)

Nesta etapa, o processo de cicatrização é responsável pelo aumento da resistência do leito reestabelecido. Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; da terceira semana, 30%, e de três meses, 80% ⁽⁵⁾.



Figura 2. Ilustração demonstrando as fase do processo de cicatrização de feridas cutâneas. Adaptado de : The 3 Stages Of Wound Healing <http://podiatryhq.com.au/wound-healing/>.

2.3 Cicatrização em desnutridos

Na maioria dos casos, o corpo tem armazenamento de proteína e energia suficientes para curar a ferida, mas o estado hipometabólico normalmente apresentado em idosos necessita então de mais tempo para o processo dessa cura, e devido à inflamação provocada por uma lesão pode-se esgotar as defesas imunitárias do corpo e prejudicar da cicatrização. Quando o suporte nutricional não é suficiente, a alimentação é utilizada para estimular a síntese de proteínas que é necessário para a cura e para reabastecer as reservas de proteína e energia, evitando o catabolismo prolongado que é um fator de risco para a imunossupressão contínua e perda fatal de proteína endógena ⁽⁴⁶⁾.

Acredita-se comumente que a desnutrição tem um efeito deletério no processo de cicatrização de feridas, e que isso representa um mecanismo importante pelo qual os pacientes desnutridos são propensos a desenvolver complicações e pior desfecho após a cirurgia. ⁽⁴⁷⁾.

Estudos experimentais sugerem que a cicatrização de feridas só é prejudicada após restrição alimentar prolongada, resultando em depleção grave ⁽⁴⁸⁾.

No tratamento de úlcera por pressão pacientes em estado de desnutrição apresentam estagnação no processo cicatricial ⁽⁴⁹⁾.

Nós investigamos a base metabólica da relação entre estado nutricional e cicatrização de feridas, medindo as mudanças na taxa de síntese de proteínas dentro da ferida cicatricial. Anteriormente, mostramos que a taxa de síntese protéica mais que dobra durante a cicatrização de feridas no músculo, e supomos que esse pode ser um dos mecanismos pelos quais o estado nutricional afeta a cicatrização, já que se sabe que a desnutrição reduz a taxa de síntese proteica e pode assim impedir a deposição de nova proteína para curar a ferida ⁽⁵⁰⁾.

Nossos estudos se concentraram na cicatrização do músculo abdominal após cirurgia abdominal. No primeiro experimento, os ratos foram desnutridos, restringindo a ingestão de alimentos a 50% do normal por 7 dias. Isso resultou em um déficit de 14% no peso corporal. Eles foram então submetidos a uma laparotomia e mantidos na dieta restrita por mais 2 dias, após o que a síntese de proteínas foi medida *in vivo* usando a técnica de dose de inundação ⁽⁵¹⁾.

Embora esse tratamento dietético tenha causado uma redução significativa na taxa de síntese protéica em outros músculos, não impediu o aumento da síntese protéicaproteica no músculo lesionado. Repetimos o experimento com outro grupo de ratos desnutridos e descobrimos que a síntese proteica na cicatrização da ferida abdominal ainda estava intacta sete dias após a cirurgia. Esses ratos também não mostraram comprometimento da deposição de colágeno ou resistência à tração na ferida ⁽⁵²⁾.

Subsequentemente, expandimos esses estudos impondo graus mais severos de desnutrição aos ratos, por exemplo, alimentando uma dieta com baixo teor de proteína (2%) por duas semanas antes da cirurgia ou privando os ratos por 48 horas após a cirurgia. Em ambos os casos, o aumento na síntese de proteínas na ferida de cicatrização não foi prejudicado. ⁽⁵²⁾.

Esses resultados podem ser interpretados como indicando que a cicatrização de feridas tem uma alta prioridade biológica e é preservada mesmo quando outras funções são afetadas pela desnutrição. O mesmo parece se aplicar à atividade reprodutiva, já que as mulheres desnutridas são capazes de dar à luz bebês saudáveis e bem-desenvolvidos e produzir quantidades adequadas de leite materno ⁽⁵³⁾.

Um estudo transversal que investigou o status de micronutrientes extracelulares analisando a porcentagem de vários micronutrientes como retinol, ácido ascórbico, 25-hidroxicolecalciferol, α -tocoferol, β -caroteno, selênio e zinco, das proteínas albumina, pré-albumina e proteína C-reativa, e marcadores antioxidantes da capacidade antioxidante, peróxidos e malondialdeído, e encontrou correlações entre os micronutrientes selecionados onde as concentrações plasmáticas reduzidas aumentaram os níveis de estresse oxidativo levando a um processo inflamatório aumentado nas lesões ⁽⁵⁴⁾.

A relação entre a insuficiência de vitamina D pode ser fator desencadeante para o desenvolvimento e retardo na cicatrização de úlceras, pois esta vitamina pode ter relação direta em componentes do sistema imune ^{(10) (55)}.

Há uma associação direta entre a avaliação nutricional tardia incluindo o índice de massa corporal e níveis de albumina sérica com a incidência de dispnéia, disfagia, odinofagia, diminuição na ingestão de alimentos com ausência de a cicatrização completa das lesões cutâneas e aumento do tempo de cura para lesões tendo ⁽⁹⁾.

A deficiência de albumina de soro, transtiretina, proteína C-reativa da área da lesão proporciona complicações da ferida como aumento na incidência de infecções retardando ainda mais o processo cicatricial e proporcionando uma cura longa com prognóstico de cura demorado, podendo o tecido restabelecido apresentar características frágeis onde a reincidência de lesão poderá ocorrer devido à esta fragilidade ⁽⁵⁶⁾.

O nível de pré-albumina pré-operatório em enxertia de pele pode ser observado em um estudo e sinalizou um possível retardo na cicatrização demonstrando que indivíduos que apresentam estes níveis diminuídos requerem maior tempo para o fechamento da lesão ⁽⁵⁷⁾.

A albumina sérica e contagem de células brancas do sangue baixas, diminuída concentração de proteínas, incidência de constante nutrição parenteral total, e cirurgias recorrentes nos idosos desnutridos foram associados com a morte juntamente com o longo tempo de operação devido ao sangramento operatório, ambos os indicadores de complexidade cirúrgica pois a inflamação crônica. Desnutrição e insuficiência hepática levam à uma capacidade de cicatrização prejudicada sendo importantes razões também para o fracasso de um processo cicatricial pós operatório sugerindo um melhor aporte nutricional e um planejamento cuidadoso na avaliação pré operatória ⁽⁵⁸⁾.

2.4 Terapia por Photobiomodulação

A palavra LASER é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation que significa radiação de luz por emissão estimulada de radiação eletromagnética, tendo seu princípio descrito por Albert Einstein em 1916 ⁽⁵⁹⁾.

O LASER é um tipo de radiação eletromagnética não ionizante, monocromática e unidirecional sendo que estas características permitem a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos, proporcionando assim variados tratamentos na sua forma em alta ou baixa em potência, sendo que a interação com o tecido biológico depende do comprimento de onda, da densidade de energia e da potência do laser ⁽⁵⁹⁾.

O termo fotobiomodulação refere-se ao uso de fótons em uma irradiância não térmica para acelerar a atividade biológica. As principais aplicações médicas da PBMT são a redução da dor e da inflamação, a diminuição no tempo do reparo tecidual, a promoção da regeneração de diferentes tecidos e nervos, a prevenção de danos nos tecidos, apresentando diminuição do nível de TNF- α e NF-kB, e regulação dos níveis de proteína, de VEGF, FGFR-1, HIF-1 α e de metaloproteinases de matriz-2 e 9 em comparação com os controles como demonstrou um estudo realizado em lesões por queimaduras em ratos tratados com LASER de Ga-As 904 nm com potência de saída média de 0,7 mW; 0,4 mW / cm² de irradiância média; 0,2 J / cm² de fluência total onde as fotomicrografias mostraram não haver inflamação e apresentou aumento na deposição de colágeno ⁽⁶⁰⁾.

O mecanismo associado a fotobioestimulação celular apresenta uma ampla gama de efeitos nos níveis molecular, celular e tecidual. Acredita-se que o mecanismo biológico básico por trás dos efeitos da PBMT seja a absorção da luz vermelha pelos cromóforos mitocondriais, em particular a citocromo c oxidase (CCO), contida na cadeia respiratória localizada dentro das mitocôndrias ⁽⁶¹⁾.

Os espectros de absorção obtidos para CCO em diferentes estados de oxidação foram registrados e encontrados como muito similares aos espectros de ação para respostas biológicas à luz. Hipotetiza-se que essa absorção de energia luminosa possa causar fotodissociação do óxido nítrico ⁹ levando ao aumento da atividade enzimática, do transporte de elétrons, da respiração mitocondrial e da produção de trifosfato de adenosina ⁽⁶²⁾.

Por sua vez, a PBMT altera o estado redox celular, que induz a ativação de inúmeras vias de sinalização intracelular, e altera a afinidade dos fatores de transcrição relacionados à proliferação celular, sobrevivência, reparo e regeneração tecidual ⁽⁶³⁾.

O sucesso da PBMT e seus respectivos efeitos são dependentes do comprimento de onda, da energia aplicada, da dose utilizada e do tempo de aplicação, sendo estes parâmetros responsáveis pelos resultados encontrados nos mais variados estudos apresentados na literatura, tais como aumento na proliferação celular, na produção mitótica, na síntese de proteínas ⁽⁶⁴⁾ aumento na produção de colágeno e diminuição do stress oxidativo aumentando ⁽¹⁶⁾.

Há uma janela óptica entre cerca de 650 nanômetros (nm) a 1200 nm em que o processo de penetração da luz nos tecidos biológicos são maximizados, para tanto a utilização da fotobiomodulação utiliza vermelho e infravermelho próximos aos 600-1100 nm ⁽⁶¹⁾.

De acordo com a Primeira Lei de Fotoquímica, os fótons de luz devem ser absorvidos por cromóforos que são fotoreceptores moleculares para ocorrer a reação fotoquímica ⁽⁶⁵⁾.

Através de fótons e a energia depositados nos tecidos ocorre um efeito biológico estimulando a produção de ATP gerada pela célula atuando diretamente na mobilidade iônica, dessa forma potencializando a bomba de

sódio e potássio, mantendo com maior eficácia a diferença de potencial de ação intracelular e extracelular (66)

Quando a célula é submetida à fotobioestimulação, observa-se um aumento na produção de ATP, maior atividade da enzima fosfatase alcalina, o que incrementa a proliferação celular, e ainda maior expressão de citocinas como IL-6, sugerindo que a irradiação a laser tem efeito terapêutico adicional por estimular a produção de citocinas, promovendo a comunicação intercelular, sua migração e sua proliferação para auxiliar no processo de cicatrização tecidual (67).

As mitocôndrias desempenham um papel importante na geração de energia e metabolismo, e por componentes da cadeia respiratória celular na membrana plasmática, sendo que ambas estão envolvidas no mecanismo de efeitos da fotobiomodulação, pois é onde acontecem a absorção de radiação visível e são consideradas como os principais mecanismos de ação da luz a nível celular (63).

Um estudo onde foi realizada a fotobioestimulação em mitocôndrias isoladas, o resultado apresentou aumento do potencial electroquímico de prótons e da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (68), aumento da síntese de RNA e proteína, e um aumento do consumo de oxigênio, do potencial de membrana mitocondrial, e da síntese de ATP e NADH (69).

O citocromo c oxidase (CCO) apresenta ser o principal fotoreceptor à luz vermelha nas células, tendo semelhanças ao espectro de absorção em diferentes estados de oxidação (62). Na interação da fotobiomodulação, este pode produzir uma mudança no potencial redox aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e atividade redox das células e estas respostas catabólicas podem induzir mudanças em fatores de transcrição regulados por mudanças no estado redox celular sendo o mais importante o fator nuclear kB (NF-kB) (63) (70).

A produção ou a liberação, ou seja, a regulação de óxido nítrico (NO) através da fotobiomodulação, pode ocorrer a partir da mitocôndria por dissociação a partir de armazenamentos intracelulares (71), ou por dissociação de NO a partir do CCO (72).

2.5 Cicatrização e Fotobiomodulação por Laser

Estudos envolvendo a utilização da PBMT apresentaram incremento na cicatrização tecidual aumentando a produção de radicais livres e de peróxido lipídico quando irradiadas no comprimento de onda de 660 nm ⁽⁷³⁾, em tendões de ratos análises bioquímicas dos tendões revelaram um aumento de 26% na concentração de colágeno, com o uso de LASERS HeNe de 632.8 nm HeNe diariamente a 1.0 J/ cm² (-2) por 14 dias em comparação com os controles ⁽⁷⁴⁾

A PBMT em 904 nm potência de saída média de 0,7 mW de irradiância média; 0,2 J/cm² de fluência total reduziu a resposta inflamatória e foi capaz de aumentar a proliferação celular, a deposição de colágeno e contração da ferida no processo de reparo de feridas de queimaduras, diminuindo o nível de TNF- α e NF-kB, e regulados os níveis de proteína de VEGF, FGFR-1, HSP-60, HSP-90, o HIF-1 α e metaloproteinases, reduzindo a resposta inflamatória e aumentando a proliferação celular ⁽⁷⁵⁾.

O tratamento a laser com 50 mW em 808 nm e dos e fluência de 142,4 J / cm² foi mais eficiente que 100 mW na redução da inflamação celular e diminuiu a expressão de IL-1 β e IL-6. No entanto, o tratamento de 100 mW levou a uma redução maior do TNF α em comparação com o tratamento de 50 mW ⁽¹²⁾.

O tempo de exposição avaliado em 810 nm com 5 e 50 mW com energia de 3 e 30 j/cm² respectivamente durante 5 dias demonstrou após análise no marcador inflamatório prostaglandina sérica E2 (PGE₂), que tempos de iluminação mais longos foram mais eficazes do que os tempos curtos e é altamente eficaz no tratamento inflamatória reumatóide nestes parâmetros ⁽⁷⁶⁾.

Os grupos tratados com laser de baixa intensidade mostraram uma redução estatisticamente significativa na ferida em lesões cutâneas de rato aumentando a repitelização e a cicatrização e tem um efeito imunomodulador em TGF-beta expressão em locais de cicatrização de feridas, nos parâmetros de 15 mW de potência, com uma dose de 3,8 J / cm² (2), por 15 segundos ⁽⁷⁷⁾.

Dois grupos laser de 660nm a uma fluência de 30 ou 40J / cm² e cirurgia de retalho cutâneo irradiada com laser de 780nm em uma fluência de

30 ou 40J / cm² e em ambos a irradiação foi capaz de modular a secreção de VEGF, a atividade de MMP-2 e a expressão de HIF-1 α ⁽⁷⁸⁾.

A angiogénese, o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, representa um excelente alvo terapêutico para o tratamento de cicatrização de feridas e doença cardiovascular, e a fotobiomodulação aumenta a expressão de VEGF e proliferação de células endoteliais vasculares através da ativação de ERK / Sp1 via, sendo importante aspecto no processo de reparo tecidual ⁽⁷⁹⁾.

As vantagens da fotobiomodulação foram observadas em tratamento de estenose de traquéia reduzindo a gravidade do processo inflamatório biomodulando a quantidade de tecido de granulação e melhorando o tratamento da cicatrização da estenose traqueal ⁽⁸⁰⁾.

Na odontologia os tratamentos com as irradiações em tratamentos peiodontais de periodontites utilizando um laser de diodo com um comprimento de onda de 808 nm com densidade de energia de 4 J / cm² (2), irradiados no primeiro, segundo e sétimo dia de tratamento, mostraram significativa melhora no índice de sangramento do sulco, na dor e edemama apesar de não ter apresentado melhora nos índices de cura após a fotobiomodulação ⁽⁸¹⁾.

Ainda na odontologia, resultados na melhora de tratamentos orais foram observados após procedimento de remoção cirúrgica de pré molares reduzindo o desconforto pós operatório relacionado a dor apesar de não haver melhorado o processo de cicatrização quando tratados com 5,1 J (60 J / cm²) de densidade de energia de um laser diodo de gálio-alumínio-arseneto (GaAlAs) com comprimento de onda, 830 nm; potência de saída, 0,1 W) em três pontos diferentes intraoralmente, 1 cm do tecido-alvo imediatamente e às 48 e 72 h após o procedimento cirúrgico ⁽⁸²⁾.

Em uma tentativa de diminuir a incidência de deiscência pós-operatórias após a reparação cirúrgica a irradiação a laser no comprimento de onda 685 nm com 25 mW de potência e energia de 0,19 J foi realizada imediatamente após a incisão cirúrgica corretiva em 23 neonatos com mielomeningocele e revelou um declínio significativo na deiscência da ferida operatória, evitando morbidades, bem como a redução do período de internação ⁽⁸³⁾.

Em deicência de safecnotomia o tratamento com a fotobiomodulação revelaram aumento do tecido de granulação, reduziu a inflamação e houve alívio da dor a partir da primeira aplicação realizada 30 dias de pós operatório (84).

Em úlceras diabéticas crônicas que não responderam a outros tratamentos a PBMT promoveu uma granulação rápida concluindo que a técnica pode encurtar o período de tempo necessário para alcançar completa cicatrização com 685 nm, densidade de energia 10 J/cm² por 20 semanas. (85).

Tratamento com PBMT no comprimento de onda de 632,8 nm, 30 mW de potência parece ser um método eficiente e viável, indolor e de baixo custo relativos às úlceras de reparação de tecidos em lesão em pé de diabético tipo II, reduzindo de maneira significativa o tamanho da ferida (86).

Os efeitos da PBMT em fibroblastos da pele humana cultivados em uma alta concentração de glicose mostraram maior viabilidade e proliferação celular sugerindo que a irradiação teve efeito estimulatório sobre a taxa de proliferação em densidades de energia de 0,5, 1 e 2 J / cm² (13).

Em queimados diabéticos a taxa de falência do enxerto e amputação é alta devido à perfusão tecidual prejudicada e o tratamento utilizando de 650 nm , 2 J/cm² para o leito da úlcera e um infravermelho de 810 nm laser de luz 6 J/cm (2) para as margens proporcionou completa cura em oito semanas de tratamento mostrando ser este um tratamento promissor para vítimas de queimaduras, especialmente diabéticos (87).

2.6 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 ⁽⁸⁸⁾ ⁽⁸⁹⁾

As alterações das propriedades mecânicas da pele após um processo lesivo ou tratamento cirúrgico começaram a serem descritas a vários anos atrás, quando foi demonstrado a importância do colágeno na melhora da resistência do pele ⁽⁹⁰⁾ ⁽⁹¹⁾. O colágeno sintetizado pelas células tem uma importância fundamental na constituição da matriz extracelular no tecido conjuntivo, sendo responsável por suas propriedades físicas. O colágeno pode formar fibras com organizações específicas dependendo do tecido biológico e esta organização pode sofrer perturbações importantes após o processo lesivo ⁽⁹²⁾.

Estas alterações quantitativas e qualitativas do colágeno interferem diretamente nas propriedades mecânicas do tecido biológico ⁽⁹³⁾. 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 ⁽⁹⁴⁾ ⁽⁹⁵⁾.

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 ⁽⁹⁶⁾ ⁽⁹⁷⁾. No entanto o colágeno pode sofrer ação de enzimas específicas que promovem sua biodegradação, reduzindo de forma significativa suas propriedades mecânicas ⁽⁹⁸⁾. 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 esclarecidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da fotobiomodulação na fase de proliferação no reparo de feridas cutâneas induzidas em ratos desnutridos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Analisar a ação da terapia por fotobiomodulação na imunomarcagem de MMP3 e MMP9.

2- Analisar a ação da terapia por fotobiomodulação no colágeno total, colágeno tipo I e colágeno III, analisado por microscopia por luz polarizada.

3- Analisar a ação da fotobiomodulação no comportamento das propriedades mecânicas do tecido cicatricial por meio de máquina universal de ensaio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

A amostra foi composta por 40 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* machos adultos com 12 semanas, provenientes do biotério central da Universidade Nove de Julho, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água *ad libitum*, 20 animais receberam alimentação hipoprotéica a 8% a ser descrita no protocolo do quando 4.3, e 20 animais controle receberam dieta normoproteica comercial Nuvilab a 25 %.

4.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho e aprovados sob protocolo (AN 0031.2014), e estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Science.

4.3 Dieta

Foram empregados dois padrões de dieta semi purificadas para o experimento: dieta normoproteica (comercial NUVILAB) contendo 25% de proteína (caseína de alto valor biológico) e dieta hipoprotéica, contendo 8% de proteína (caseína, sendo a diferença substituída por amido), conforme descrito no quadro 1.

4.4 Protocolo de desnutrição

O protocolo de desnutrição ⁽⁹⁹⁾ ⁽¹⁰⁰⁾ foi iniciado ao desmame, quando os animais passaram a receber uma ração especial com baixo teor de proteína (8,40%) (caseína, sendo a diferença substituída por amido), e dieta normoproteica contendo 25% de proteína (caseína de alto valor biológico) e dieta hipoproteica, conforme descrito no quadro 1.

Quadro 1. Composição da ração hipoproteica utilizada no protocolo de desnutrição

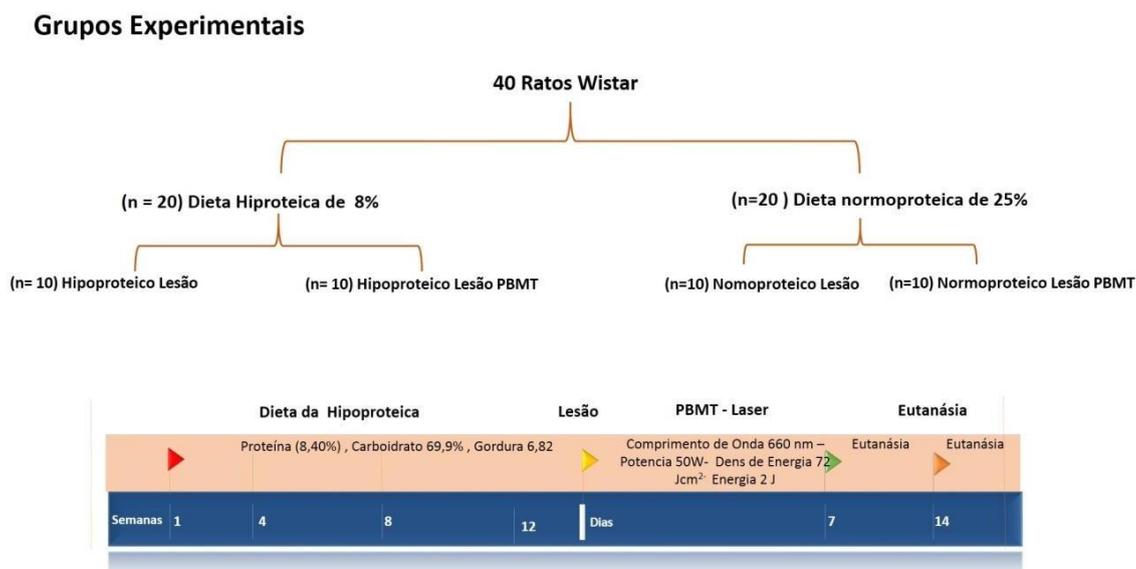
Perfil Calórico	%	% Kcal
Proteína	8,40	9,05
Carboidrato	69,09	74,42
Gordura	6,82	16,53
Kcal/g	3,7	-

4.5 Grupos experimentais

Para compor os grupos experimentais do projeto foi realizado um cálculo amostral com base nos estudos de Rambo et al., (2014), com poder de teste de 80 e nível alfa de 0,05, resultando em uma amostra mínima de 05 animais, por grupo, totalizando 40 animais ⁽¹¹⁾.

Foram utilizados 40 ratos. Vinte (20) ratos receberam dieta hipoproteica, vinte (20) ratos receberam dieta normoproteica. Estes animais foram distribuídos em 2 subgrupos conforme o tempo experimental de 7 e 14 dias após a confecção das lesões, conforme a Figura 3.

Figura 3. Distribuição dos grupos e sub grupos experimentais.



4.6 Confeção das lesões cutâneas experimentais

Após a pesagem, os animais foram anestesiados, com uma mistura 87 mg/Kg, Dopalen® e xilazina 13 mg/Kg, Anesadan® e Vetbrands por via intra peritoneal.

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral, o local foi desinfectado com o álcool-iodado, e foi realizada a tricotomia na região do dorso do animal.

Para realização de cada uma das 4 feridas, foi utilizado um "punch" de 8mm de diâmetro permitindo a remoção de uma área circular da pele.

Foram realizadas 4 feridas em cada animal, com localização a porção média / lateral do plano sagital mediano.

Após a confecção das feridas os animais foram colocados em gaiolas limpas, sendo 01 em cada uma, com água e ração apropriada de acordo com o grupo experimental.

Foi utilizado como medicamento analgésico Tramadol (TRAMAL - Teuto®) por 3 dias após a confecção das lesões cutâneas na dose de 5 mg/kg, de 4/4 horas, via intra-muscular, para evitar que os animais tivessem dor.

4.7 Terapia por fotobiomodulação

A fotobiomodulação foi aplicada utilizando um laser de baixa intensidade, modelo Thera Laser da marca DMC operando no comprimento de onda 660 nm, densidade de energia de 72 J/cm² com a potência de 50 mW, sendo a área do feixe de 0,028 cm², energia entregue de 2 Joules, área total de energia de 08 Joules, com um tempo de irradiação de 40 segundos por ponto.

A aplicação da irradiação foi iniciada após a confecção das lesões cutâneas, e em dias alternados, nos grupos experimentais normoproteico tratados e hipoproteico tratados até o dia da eutanásia de cada grupo. Os normoproteicos e hipoproteicos não tratados não receberam tratamento.

Tabela 1 – Parâmetros da terapia por fotobiomodulação.

Densidade de Energia	72J/cm ²
Comprimento de onda	660 nm
Potência	50W
Área do feixe	0,028 cm ²
Tempo de Aplicação	40 segundos
Técnica	contato
Energia	2 J
Densidade de Potência	1,78 J/cm ²
Energia Total	8 J

4.8 Eutanásia

Os animais foram identificados, pesados e posteriormente eutanasiados administrando-se, Tiopental (THIOPENTAX - Cristália) dose de

100mg/kg (DL) por via intraperitoneal associado a lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália).

As amostras obtidas foram distribuídas da seguinte maneira: amostras congeladas e armazenadas em freezer -80 graus para teste de resistência mecânica; amostras fixadas em formol a 10% para procedimentos histológicos e de imunohistoquímica..

4.9 Procedimentos histológicos e quantificação

As amostras foram fixadas com formol e submetidas à técnica histológica clássica para inclusão em parafina, composta pela seguinte sequência: desidratação em concentrações crescentes de álcool; diafanização com xilol que permitiu a penetração de parafina na peça; impregnação em banhos de parafina e inclusão em moldes; cortes transversais com uma espessura de 4 (μm) micrometros e montagem em bálsamo sintético. As secções obtidas foram coradas em Picrosírus red.

A observação das fibras de colágeno coradas por picrosirius red foi realizada por meio de luz polarizada, uma vez que este método permite a diferenciação do colágeno tipo I (birrefringência laranja-amarelo a laranja e vermelho) e tipo III (birrefringência verde ou amarelo-verde). De cada lâmina, cinco (5) campos histológicos foram capturados com câmera digital (5,0 mm) as fotomicrografias foram realizadas com aumento de 40x. As imagens foram analisadas com auxílio do software Image-Pro Plus 4.5, (Media Cybernetics, MD, EUA), obtendo-se o percentual de colágeno de cada tipo I e III de acordo com a seleção e medição de áreas com base na cor. (Figura 4 e 5)

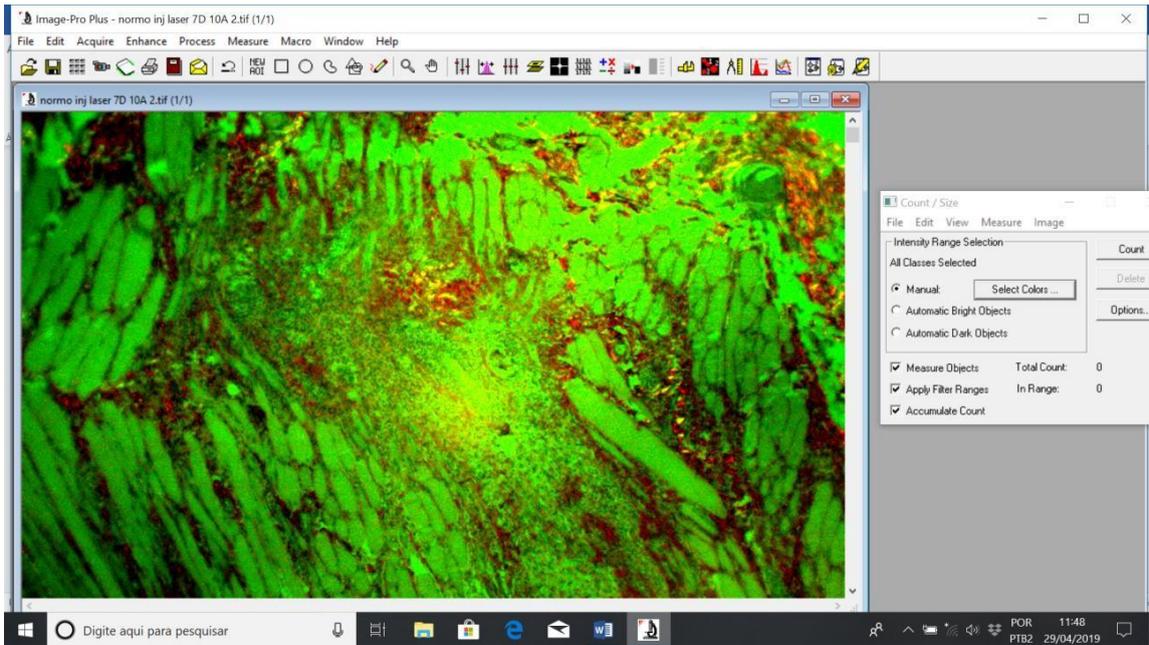


Figura 4. Imagem ilustrativa da tela do programa Image-Pro plus 4.5 utilizado na quantificação do colágeno tipo I e III.

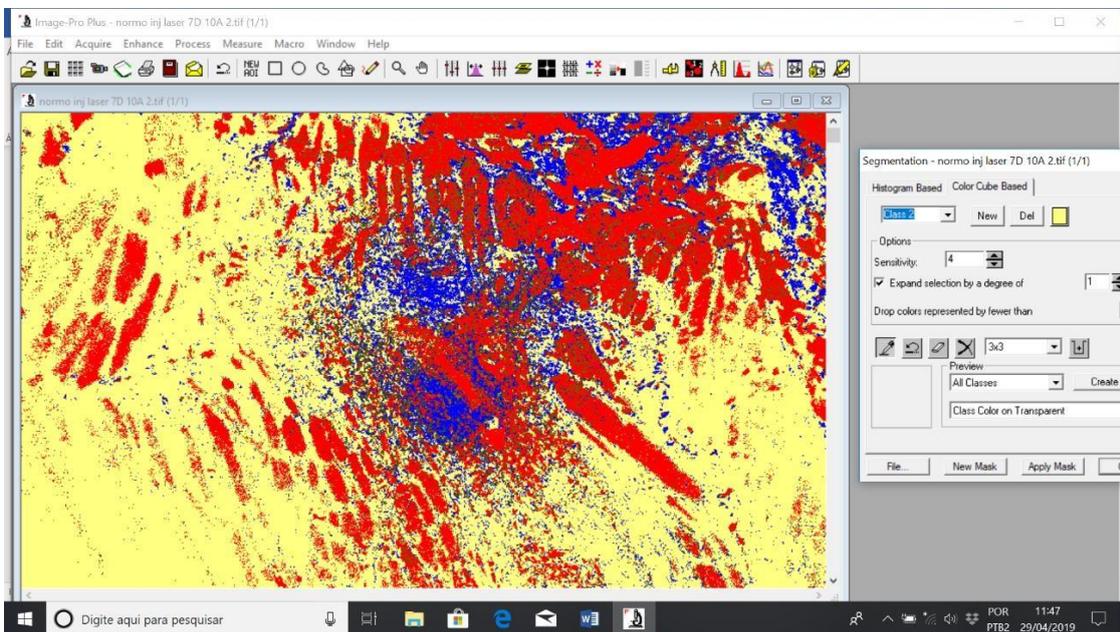


Figura 5. Imagem ilustrativa da utilização da ferramenta de macro do Image-Pro plus 4.5, na segmentação do colágeno.

4.10 Teste de propriedades mecânicas da pele

O ensaio de tração foi realizado em equipamento do tipo Tensiômetro Máquina Universal de Teste, 200N que possui interface com microcomputador e os dados do ensaio foram processados e expostos através do software Tesc. A amostra de pele (ferida cutânea) foi fixada à máquina universal de teste, utilizando uma garra (acessório) que contém ranhuras em sua superfície (para auxiliar na fixação da pele) mediante compressão realizada pelo ajuste de um parafuso, evitando o escorregamento do tecido cutâneo durante o ensaio (Figura 6). Após a fixação da amostra, foi aplicada pré-carga de 200 gramas (2 N) durante 30 segundos, com intuito de promover acomodação do sistema, evitando-se possíveis folgas no conjunto máquina, acessório e amostra. Após a pré-carga o ensaio prosseguiu, com velocidade pré-estabelecida de 5 mm/min. A carga aplicada foi registrada pelo software em intervalos regulares de alongamento até o momento de ruptura do tecido cutâneo. A partir dos gráficos (carga “versus” alongamento) de cada ensaio, foram obtidas e analisadas as seguintes propriedades mecânicas: elasticidade e tensão máxima (Figura 7).

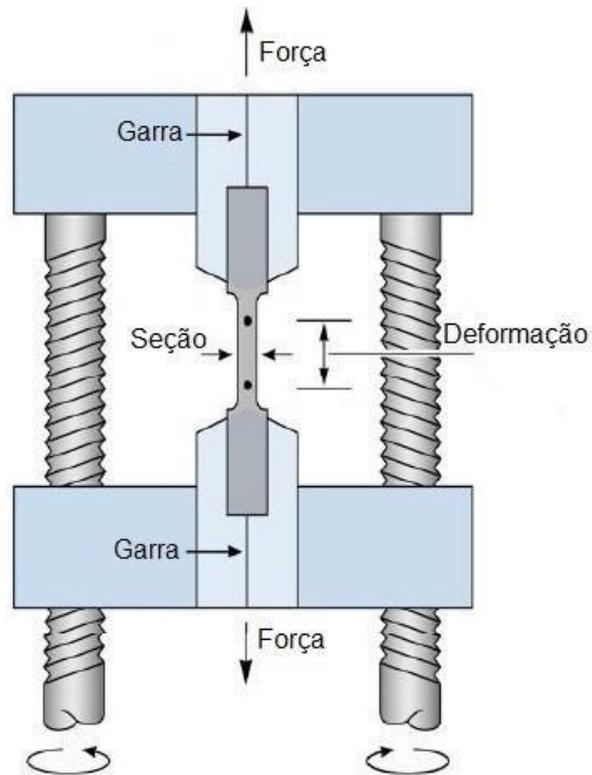


Figura 6. Representação esquemática de uma máquina universal de ensaio.



Figura 7. Ilustração da execução do teste de resistência mecânica das feridas cutâneas realizadas na máquina universal de ensaio.

4.11 Propriedades Mecânicas da Pele

Os animais foram eutanasiados após 7 ou 14 dias do início do tratamento. Dois retalhos da pele da região dorsal de cada animal, onde foram realizadas as lesões cutâneas, foram removidos para posteriores análises.

As dimensões dos retalhos cutâneos (largura, espessura) foram registradas para normalização das amostras e em seguida foram fixadas em grampos (pinças) específicas, na máquina de ensaio mecânico (Intermetric 200). Foi mantida a distância de 5 cm entre os fixadores. (Figura 8).

Imediatamente após a fixação dos retalhos cutâneos, foi realizado o ensaio cíclico de tração vertical, utilizando velocidade de carga e descarga de 10 mm/min, e aumento de 1 mm por carga até o momento da ruptura. (Figura 7).

Vários testes de carregamento e descarregamento de forças foram realizados até o momento da ruptura do tecido cutâneo. Neste momento, o teste de tração mecânico foi interrompido automaticamente. Os valores de Força máxima e Deformação até o momento da ruptura foram registrados (Figura 8)..

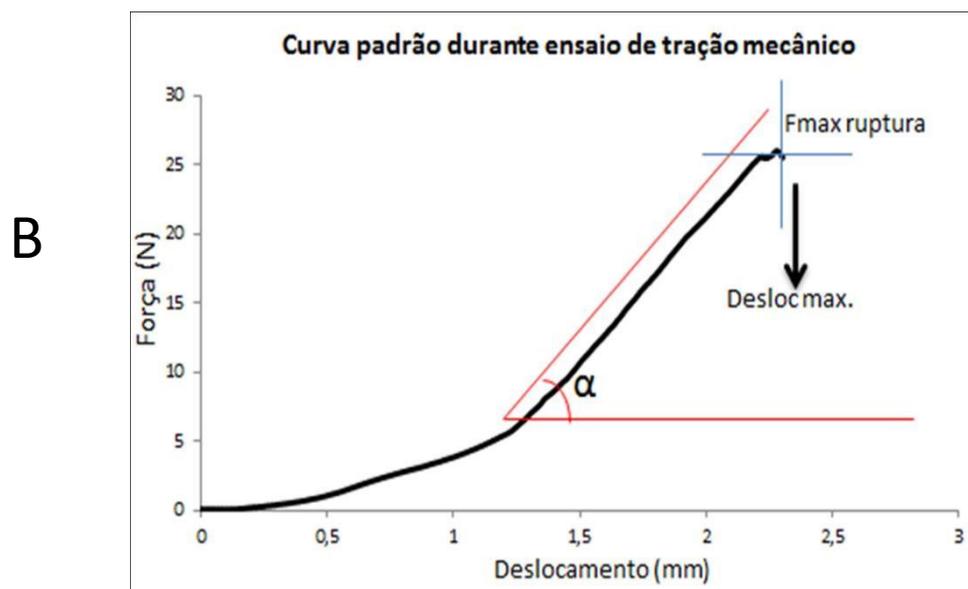
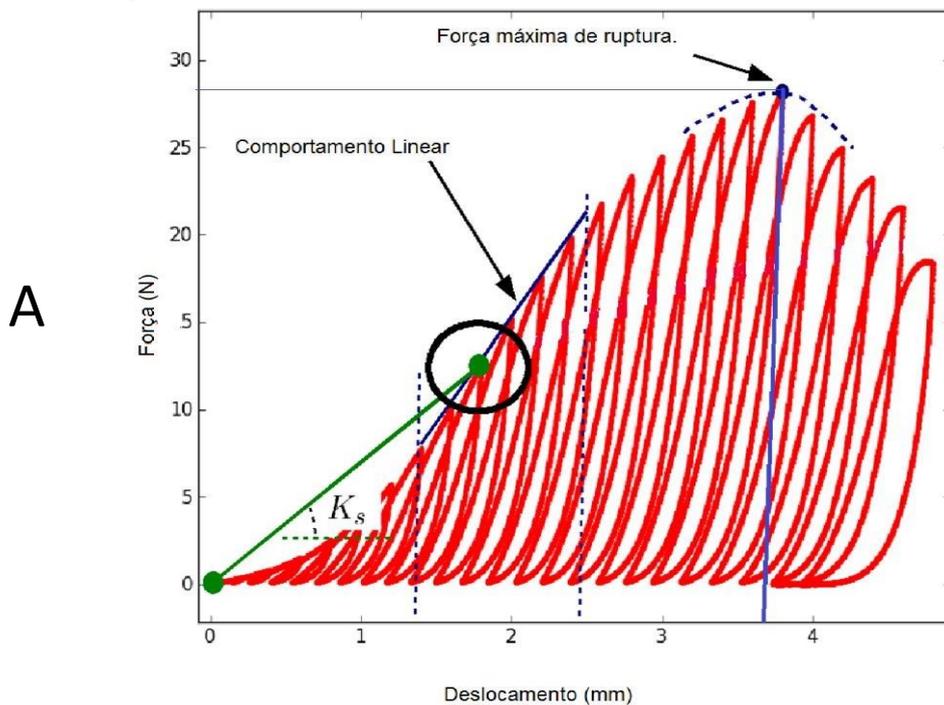


Figura 8: Gráfico do ensaio de Tração: Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento.

4.12 Imuno-histoquímica

As secções obtidas e reservadas para o procedimento de imuno-histoquímica foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e

a atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 0,3% em metanol durante 30 min. As secções foram lavadas em PBS (6 x 5 min lavagens) e montadas com soro de cabra normal a 1% em PBS durante 30 min. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas na presença de anticorpo primário aplicado durante a noite a 4° C. Os anticorpos primários utilizados foram: SOi (1:1000) ; MMP-3: anticorpo de coelho anti-MMP-3 (1:500), (ab-53015, Abcam, Tóquio, Japão), MMP-9: anticorpo anti-MMP-9 (1:500), (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), uma reação de coloração foi realizada com diaminobenzidina (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão) e os núcleos foram contra corados com hematoxilina. As áreas de coloração positiva para cada uma das marcas foram observadas sob um microscópio de luz (E200, Nikon, Japão) e as imagens foram capturadas por um microcomputador equipado com o software IC Capture 2.2 (The Imaging Source, Alemanha). De cada amostra, 4 imagens foram gravadas de diferentes campos de visão, incluindo cada parte do corado, usando uma objetiva de 10x para que o comprimento fosse capturado. Uma vez capturadas, as imagens foram analisadas usando um sistema de análise de imagens baseado em software (Image-Pro Plus® 4.5, Media Cybernetics, MD, EUA).(Figura 9)

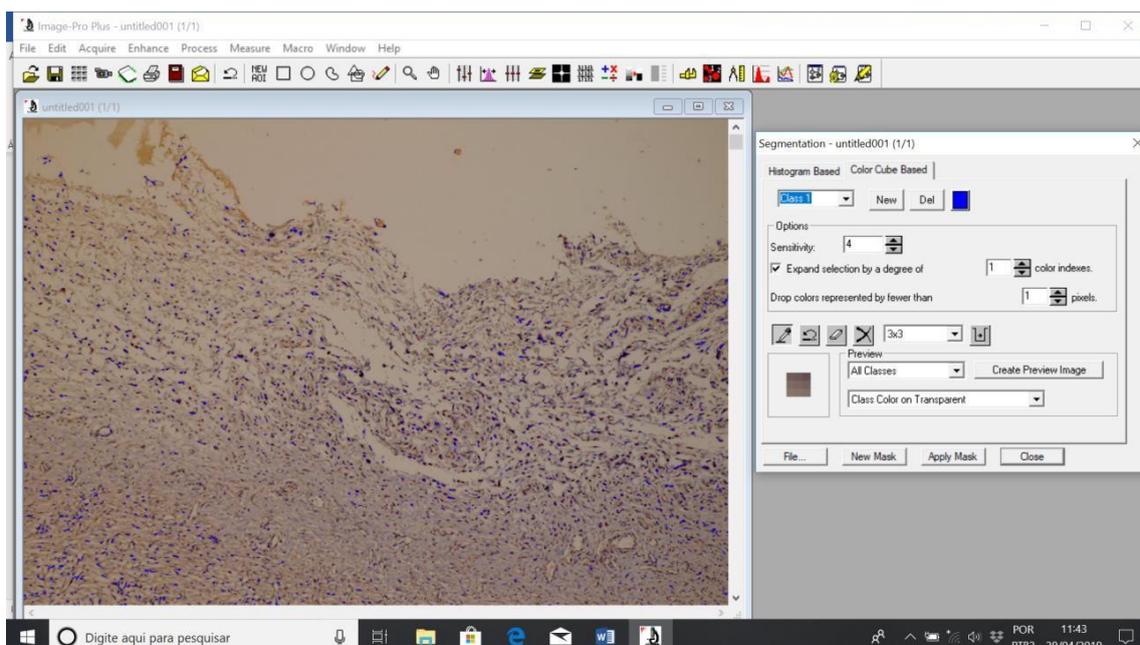


Figura 9. Imagem ilustrativa da quantificação das áreas imuno marcadas após o procedimento de imuno-histoquímica utilizando o programa Image-Pro plus 4.5.

4.13 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2007 e inicialmente avaliados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, concluindo como resultado a distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one way e “*post hoc test*”, o teste de Bonferroni foi usado para comparações entre grupos experimentais. Todos os dados foram expressos como valores de média e desvio padrão. Utilizou-se o software Prism® 5 (GraphPad, CA, EUA). Diferenças da hipótese nula foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Picrosirius Red - Colágeno tipo I

O colágeno tipo I foi identificado por luz polarizada e quantificado em porcentagem por área analisada (mm^2). Aos 7 dias após a realização das lesões, o grupo controle apresentou área média marcada para colágeno tipo I ($62,80 \pm 5,14$), que foi comparada estatisticamente com os seguintes grupos: lesão normoproteica ($42,87 \pm 5,62$), lesão hiperproteica ($32,59 \pm 3,04$) e hiperproteico PBMT ($39,01 \pm 4,27$), observou-se diferença estatística ($p < 0,001$), e em comparação com o grupo normoproteico PBMT ($54,87 \pm 3,62$) a diferença encontrada foi ($p < 0,01$). Na comparação entre lesão normoprotéica e os demais grupos obteve-se diferença estatística para o grupo das lesões hiperproteicas, ($p < 0,01$), os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT não apresentaram diferença estatística quando comparados. No entanto, na comparação entre o grupo com lesão hipoproteica e o PBMT normoproteico, observou-se diferença estatística ($P < 0,001$). Quando a comparação foi entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoproteico x PBMT hipoproteico), observou-se diferença estatística com valor ($P < 0,001$). (Figura 10. e 11)

Aos 14 dias, o grupo controle ($62,80 \pm 5,14$) comparado com o grupo com lesão normoproteica ($51,01 \pm 8,24$) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação com o grupo com lesão hipoproteica ($40,80 \pm 5,39$) ($p < 0,001$), mas quando comparados com os grupos que receberam tratamento, a PBMT normoproteica (61.047 ± 9.07) e a PBMT hipoproteica (55.23 ± 7.3) não apresentaram diferença estatística. No entanto, a comparação do grupo com lesão normoproteico com os demais grupos não apresentou diferença

estatística ($p > 0,05$). Já na comparação do grupo com lesão hipoprotéica houve diferença estatística ($p < 0,01$) apenas em comparação com o grupo normoprotéico PBMT. Os grupos comparados tratados com PBMT normoprotéico e PBMT hipoprotéico não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). (Figura 10 e 12)

5.2 Picrosirius Red - Colágeno tipo III

Na análise também identificada por luz polarizada e quantificada em porcentagem pela área analisada do colágeno tipo III (mm^2), observou-se que em 7 dias o grupo controle apresentou uma área média marcada para colágeno tipo III ($70,87 \pm 5,62$) que quando comparado aos grupos: lesão normoprotéica ($32,87 \pm 6,2$), obtivemos diferença estatística ($P < 0,01$). Na comparação com a lesão do grupo hiperprotéico ($28,59 \pm 3,06$) houve diferença estatística ($p < 0,001$). Nos grupos que receberam PBMT, foi encontrada uma diferença estatística com o grupo hiperprotéico PBMT ($32,01 \pm 4,91$) com ($p < 0,05$) e não houve diferença em comparação com o grupo normoprotéico PBMT ($47,87 \pm 8,67$). (Figuras 10 e 13)

Ao comparar o grupo normoprotéico com os demais grupos, houve diferença estatística apenas com o grupo normoprotéico PBMT ($p < 0,05$). Em comparação com o grupo hipoprotéico, houve diferença com o grupo normoprotéico PBMT ($p < 0,001$). Na comparação entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoprotéico x PBMT hipoprotéico), encontramos diferença entre os grupos com valor de ($p < 0,01$). (Figura 12. e 15).

Aos 14 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controle ($70,87 \pm 5,62$) e normoprotéico ($41,20 \pm 6,72$),

lesão hipoprotéica ($35,90 \pm 6,72$), PBMT hipoproteica ($40,18 \pm 6,04$); em comparação com o grupo normoproteico PBMT ($55,70 \pm 8,91$) não houve diferença ($p > 0,05$). Na comparação entre o grupo normoproteico e os demais grupos, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$), com nenhum dos grupos comparados (lesão hipoproteica, PBMT hipoproteico, PBMT normoprotéico). Quando realizamos a comparação do grupo com lesão hipoprotéica, observamos diferença apenas para o grupo normoproteico PBMT ($P < 0,01$). Na comparação entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoproteico e PBMT hipoproteico) a diferença estatística apresentada para a porcentagem de colágeno tipo III foi ($p < 0,05$). (Figura 10 e 14).

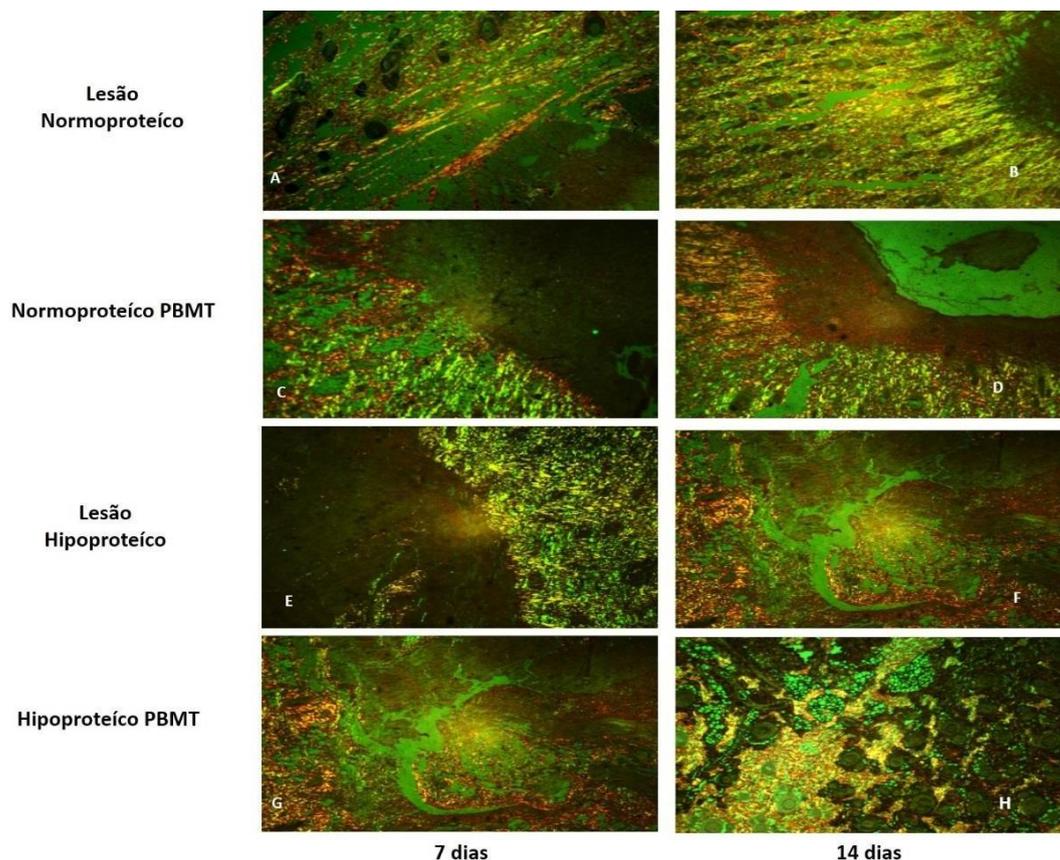


Figura 10. Imagens representativa obtidas por meio de cortes histológicos corados com picosirius red e visulados em microscópio com luz polarizada o que permitiu a contagem do porcentual de de colágeno tipo III e I, bem como o entrelaçamento aos 7 e 14 dias após a lesão experimental nos grupos normoproteico, hipoproteica, normoproteico PBMT, hipoproteico PBMT. $\times 40$. Barra de escala = $20 \mu\text{m}$.

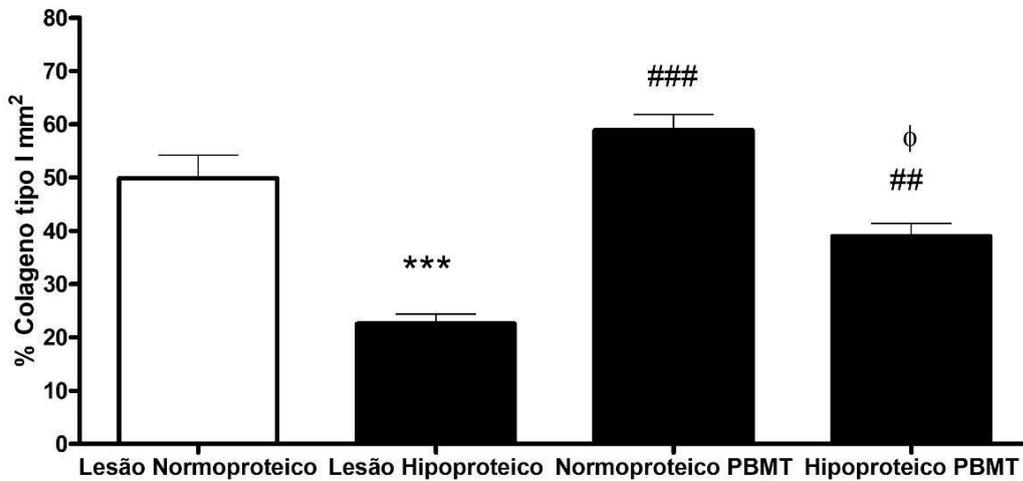


Figura 11. Representação da análise do percentual de colágeno tipo I aos 7 dias após a confecção das lesão cutâneas, comparando dos grupos: grupo de normoproteico; grupo de hipotroteico; grupo normoproteica PBMT; grupo hipotroteica PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

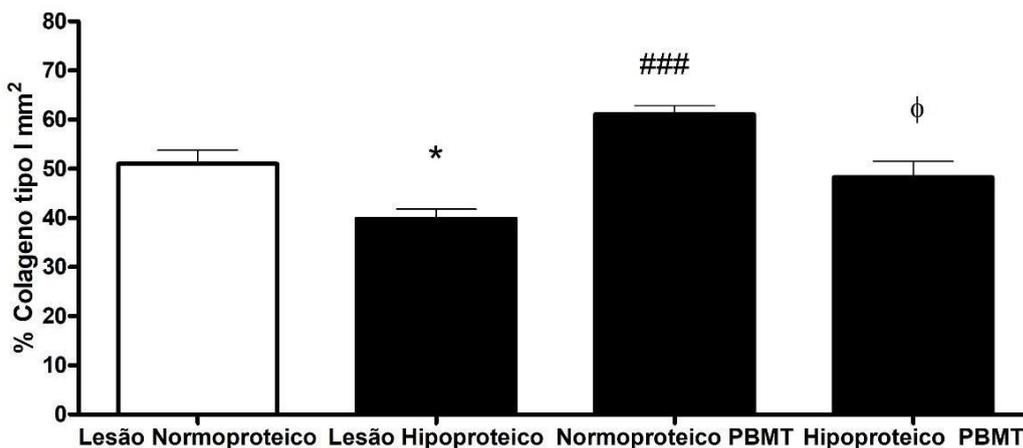


Figura 12. Representação da análise do percentual de colágeno tipo I aos 14 dias após a confecção das lesão cutaneas, comparando dos grupos: grupo de normoproteica; Grupo hipotroteico; Grupo normoproteica PBMT; Grupo hipotroteica PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; Φ P <0,05, Φ Φ P <0,01, Φ Φ Φ P, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT.

hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

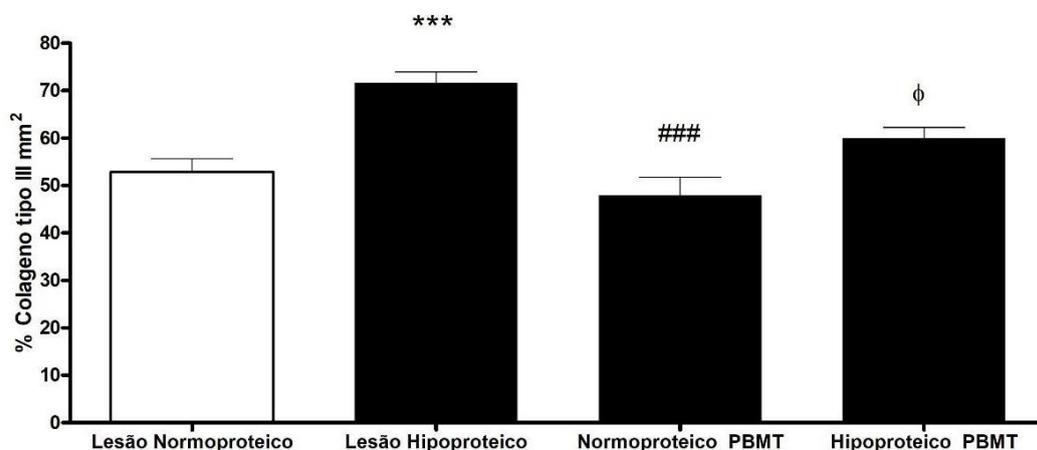


Figura 13. Representação da análise do percentual de colágeno tipo III aos 7 dias após a confecção das lesão cutâneas, comparando dos grupos: Grupo normoproteica; grupo hipotroteico; grupo normoproteico PBMT; gupo hipotroteico PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; φ P <0,05, φ φ P <0,01, φ φ φ P na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

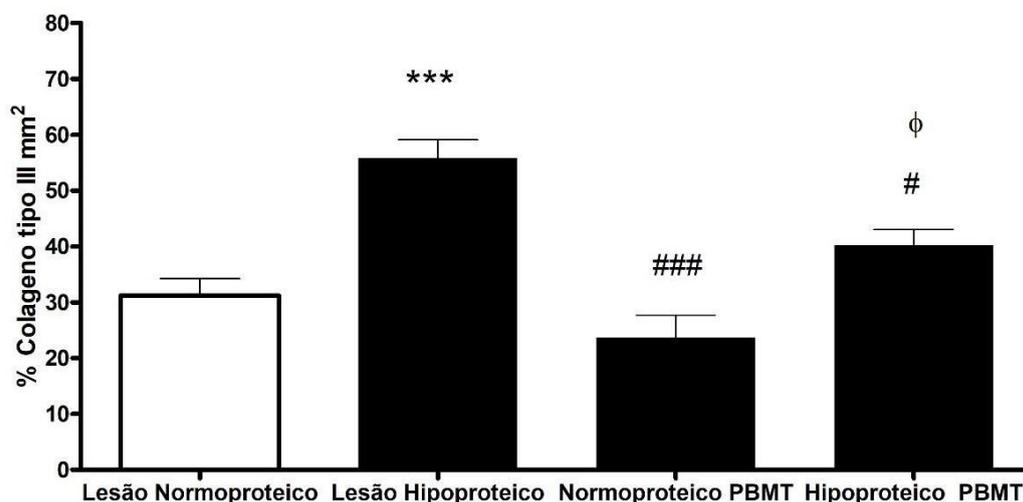


Figura 14. Representação da análise do percentual de colágeno tipo III aos 14 dias após a confecção das lesão cutaneas, comparando dos grupos grupo normoproteico; hrupo hipotroteico; grupo normoproteica PBMT; grupo hipotroteico PBMT. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). *** P <0,001 para comparação com normoproteico; ## P <0.01 e ### P <0.001 para comparação com o grupo hipoproteico ; φ P <0,05, φ φ P <0,01, φ φ φ P na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e

hipoproteico PBMT . Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

5.3 Propriedades Mecânicas da Pele

5.3.1 Força Máxima – Fmax

Os testes de propriedades mecânicas da pele foram conduzidos (Fmax, Dmax, e espessura da pele). Aos 7 dias após a realização das lesões, o grupo normoproteico apresentou área para Fmax (N) ($13,27 \pm 0,77$), que foi comparada estatisticamente com os seguintes grupos normoproteico PBMT ($12,84 \pm 0,45$); hiperproteico ($7,60 \pm 0,28$) e hiperproteico PBMT ($12,11 \pm 0,93$), observou-se diferença estatística ($p < 0,001$), apenas na comparação com o grupo hipoprotéico. Na comparação entre o grupo normoproteico PBMT e o grupo hipoprotéico, também observou-se diferença estatística de ($p < 0,001$). Quando a comparação foi entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoproteico x PBMT hipoproteico), não foi observado diferença estatística com valor ($p < 0,05$). Já na comparação entre os dois grupos hipoprotéico (tratado com PBMT e não tratado) foi verificada diferença estatísticas de ($p < 0,001$) (Figura 15).

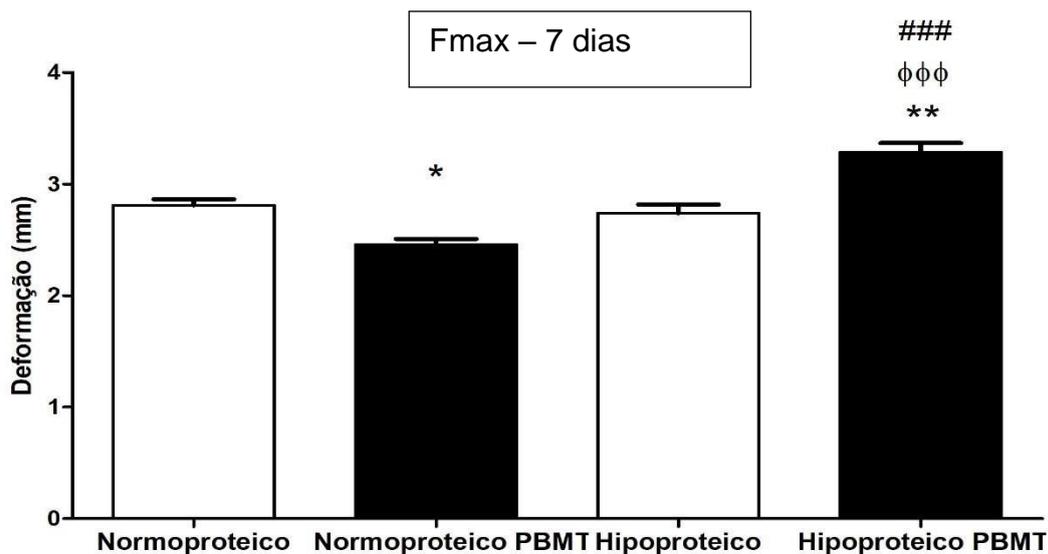


Figura 15. Comparação da Força máxima (Fmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de força máxima 7 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; φ P <0,05, φ φ P <0,01, φ φ φ P <0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

Aos 14 dias, os testes de propriedades mecânicas da pele foram conduzidos (Fmax, Dmax, e espessura da pele). Aos 14 dias após a realização das lesões, o grupo lesão normoproteico apresentou média para Fmax (N) (13,00 ± 0,66), que foi comparada estatisticamente com os seguintes grupos normoproteico PBMT (15,79 ± 0,88); lesão hiperproteica (9,03 ± 0,34) e hiperproteico PBMT (9,09 ± 0,94), observou-se diferença estatística (p <0,001), na comparação com os grupos normoproteico PBMT, hipoprotéico, hipoprotéico PBMT. Na comparação entre o grupo com lesão normoproteica PBMT e o grupo hipoprotéico, também se observou diferença estatística de (p <0,001). Quando a comparação foi entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoproteico x PBMT hipoproteico), não foi observado diferença estatística

com valor ($p < 0,05$). Já na comparação entre os dois grupos hipoprotéico (tratado com PBMT e não tratado) foi verificada diferença estatísticas de ($p < 0,001$). (Figura 16)

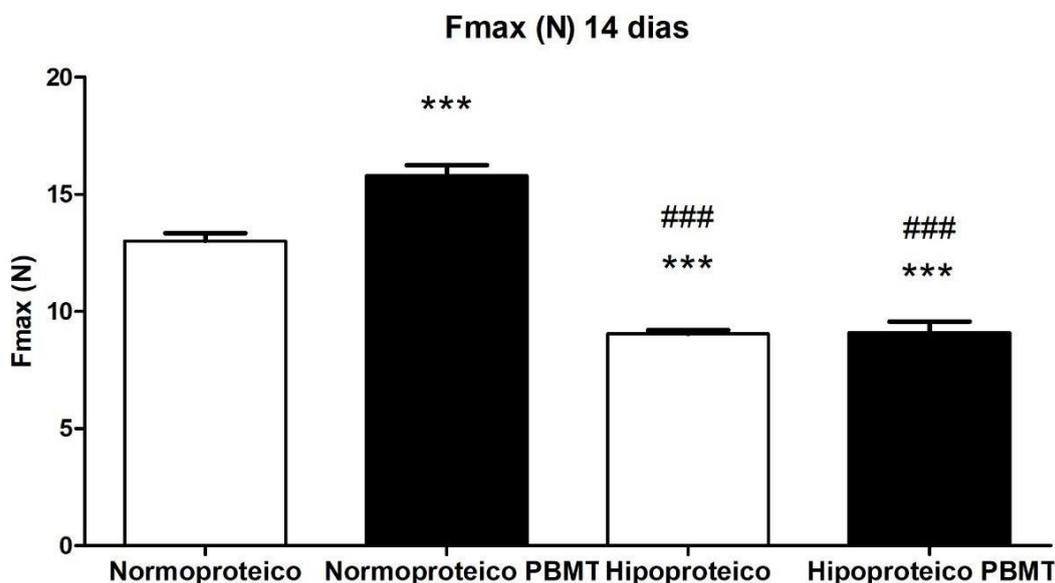


Figura 16. Comparação da Força máxima (Fmax) da pele na área da cicatriz entre normoprotéicos e hipoprotéicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de força máxima 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ para comparação com normoprotéico; para comparação com o grupo normoprotéico PBMT ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$; comparação com o grupo hipoprotéico; Φ $P < 0,05$, $\Phi \Phi$ $P < 0,01$, $\Phi \Phi \Phi$ $P < 0.001$; para comparação entre os grupos normoprotéico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

5.3.2 Deformação Máxima – Dmax

Aos 7 dias após a realização das lesões, o grupo lesão normoprotéica apresentou área para Dmax (N) ($2,80 \pm 0,10$), que foi comparada estatisticamente com os seguintes grupos normoprotéico PBMT ($2,45 \pm 0,10$); lesão hiperprotéica ($2,73 \pm 0,15$) e hiperprotéico PBMT ($3,28 \pm 0,16$), observou-se diferença estatística ($p < 0,05$), em comparação com o grupo

hipoprotéico PBMT e também para a comparação com o grupo hipoprotéico PBMT ($p < 0,01$) (Figura 17 e 19).

Na comparação entre o grupo com lesão normoproteica PBMT e o grupo hipoprotéico, também observou-se diferença estatística de ($p < 0,001$). Quando a comparação foi entre os grupos tratados com PBMT (PBMT normoproteico x PBMT hipoproteico), foi observado diferença estatística com valor ($p < 0,001$). Já na comparação entre os dois grupos hipoprotéico (tratado com PBMT e não tratado) foi verificada diferença estatísticas de ($p < 0,001$) (Figura 17 e 19).

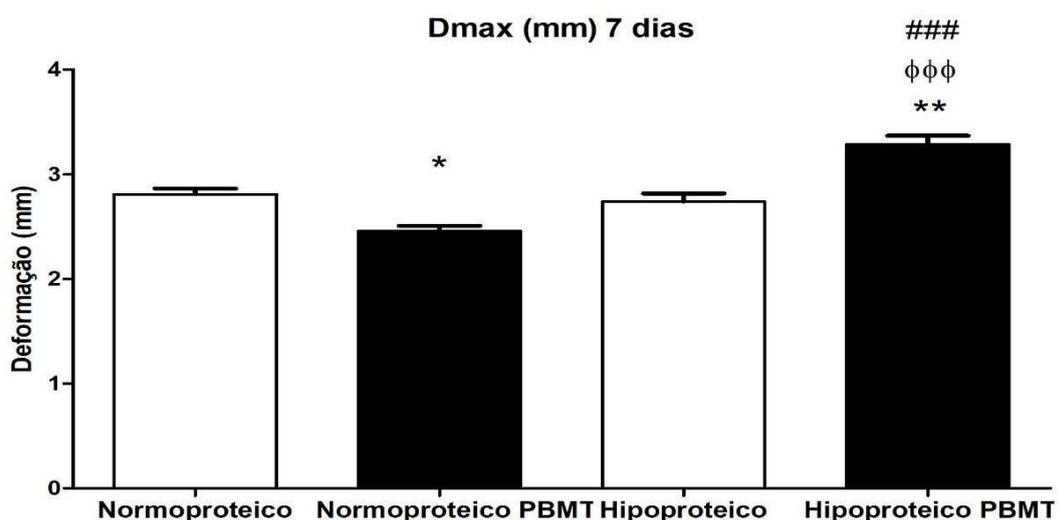


Figura 17. Comparação da Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Em A- valores de Dmax 7 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$; comparação com o grupo hipoproteico; Φ $P < 0,05$, Φ Φ $P < 0,01$, Φ Φ Φ $P < 0,001$; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

Aos 14 dias, os testes de propriedades mecânicas da pele foram conduzidos (Fmax, Dmax, e espessura da pele). Aos 14 dias após a realização das lesões, o grupo lesão normoproteico apresentou média para Fmax (N)

($3,09 \pm 0,08$), que foi comparada estatisticamente com os seguintes grupos normoproteico PBMT ($2,47 \pm 0,15$); lesão hiperproteica ($2,69 \pm 0,36$) e hiperproteico PBMT ($2,80 \pm 0,50$), não foi observado diferença estatística com no cruzamento estatístico entre os grupos tratados com PBMT . (Figura 18 e 20)

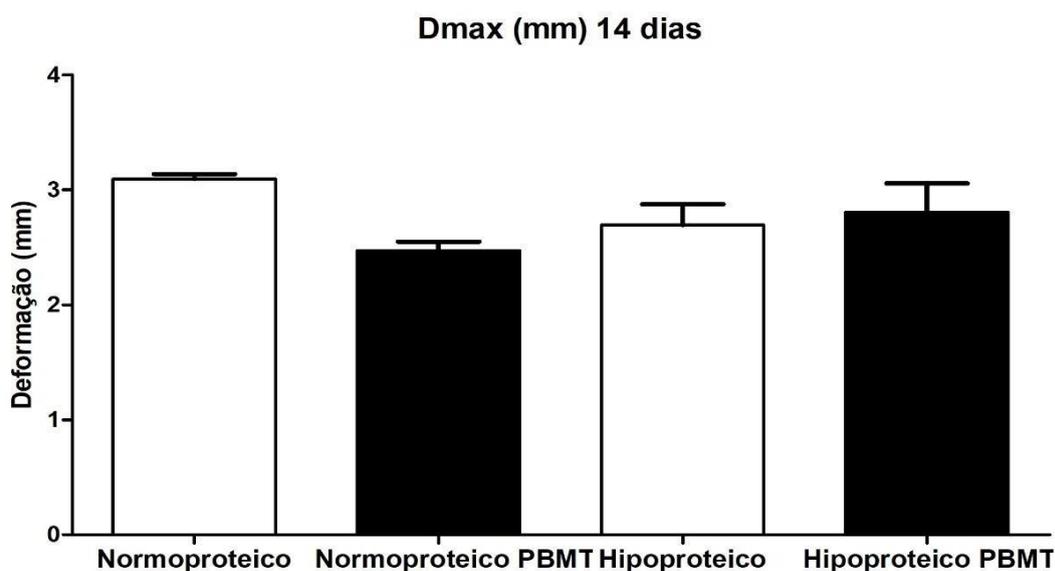


Figura 18. Comparação da Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP). * P <0,05; *** P <0,001 para comparação com normoproteico; para comparação com o grupo normoproteico PBMT ## P <0.01 e ### P <0.001; comparação com o grupo hipoproteico; Φ P <0,05, $\Phi \Phi$ P <0,01, $\Phi \Phi \Phi$ P <0.001; para comparação entre os grupos normoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações.

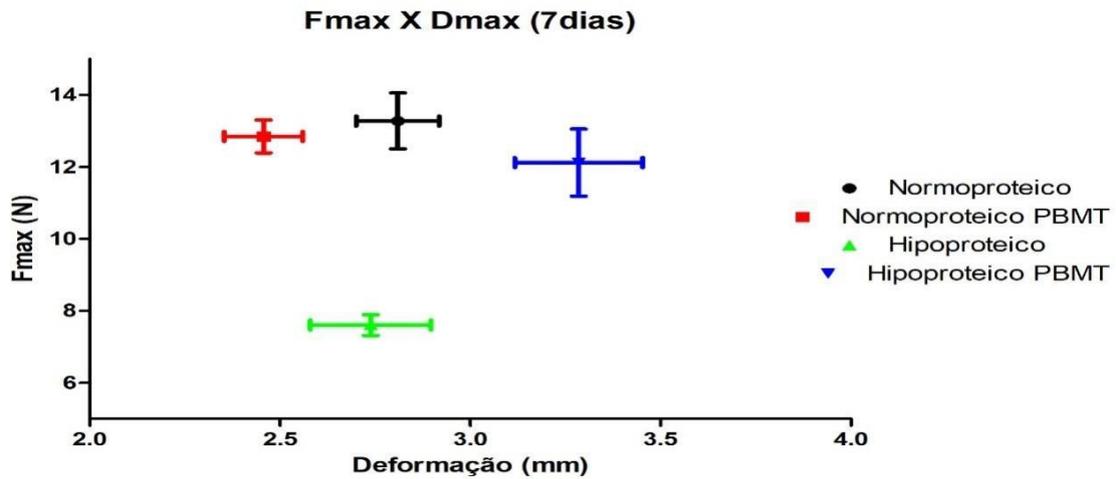


Figura 19. Comparação da relação entre Força máxima x Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Fmax x Dmax 7 dias após a confecção das lesões. Em B valores de Fmax x Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

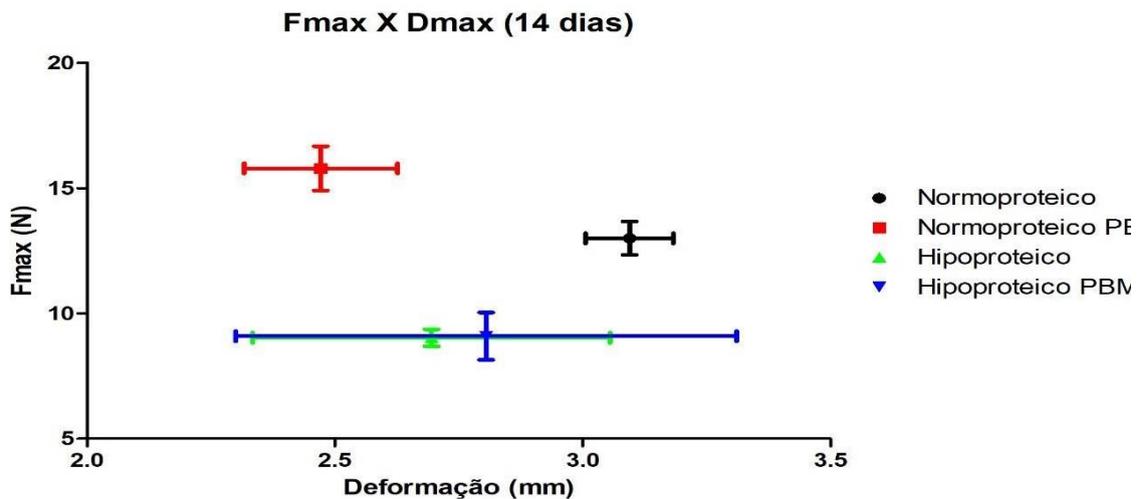


Figura 20. Comparação da relação entre Força máxima x Deformação máxima (Dmax) da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos tratados e não tratados com PBMT. Valores de Fmax x Dmax 14 dias após a confecção das lesões. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

5.3.3 Espessura da Pele

Com a finalidade de dar subsídio aos testes de propriedade mecânica também foram realizadas medidas com a utilização de um paquímetro da espessura do tecido na área cicatricial. Foram observados os seguintes valores: grupo normoproteico ($3,19 \text{ mm} \pm 0,19$) e grupo hipoprotéico ($2,93 \text{ mm} \pm 0,07$), ao serem comparados pelo teste *t student* e pela diferença das variâncias teste F, obteve-se diferença significativa entre os dois grupos de ($p=0,024$). (Figura 21)

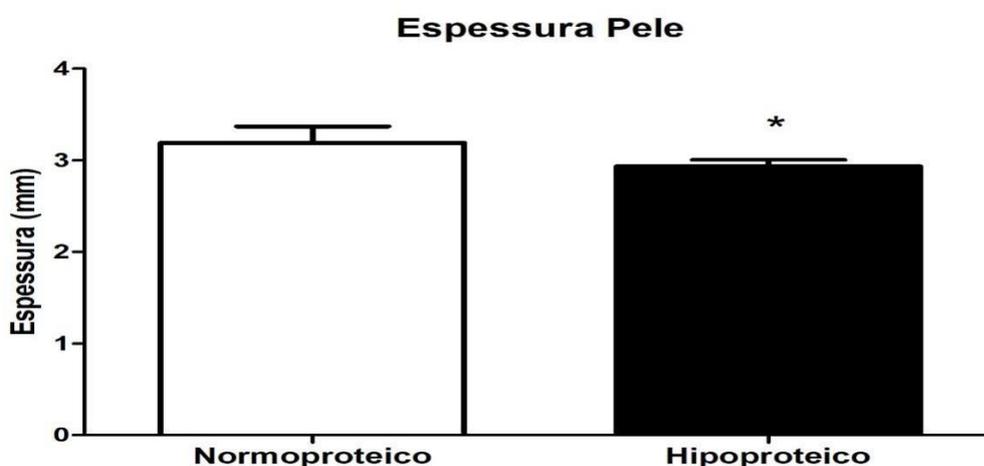


Figura 21. Comparação da espessura da pele na área da cicatriz entre normoproteicos e hipoproteicos. Dados apresentados em média e desvio padrão. Média das variâncias Test F, * $p,0,05$.

5.4 Metaloproteinases de Matriz - 3 (MMP-3).

A imunorreatividade para MMP-3 foi quantificada usando áreas positivas detectadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5. Observou-se que 7 dias após a lesão, o grupo normoproteico ($65,00 \pm 7,21$), mostrou diferença estatística na comparação com os grupos experimentais: grupo hipoprotéico ($80,4 \pm 90,1$), ($p < 0,05$); grupo normoproteico PBMT ($45,7 \pm 5,23$), ($p < 0,0'1$) e

com o grupo hipoprotéico PBMT ($63.2,31 \pm 4.1$). Houve também diferença estatística ($p < 0,001$) na comparação do grupo hipoprotéico com os grupos normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT. Quando comparamos os dois grupos tratados (normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT) obteve-se diferença estatística de ($p < 0,01$). (Figura 22 e 24 A)

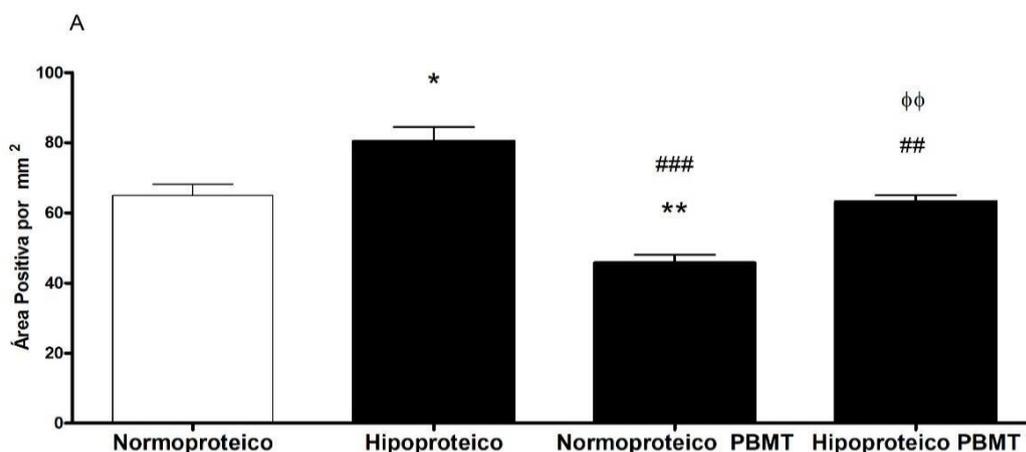


Figura 22. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-3 aos 7 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteico; grupo hipoproteico; grupo normoproteico PBMT; grupo hipoproteico PBMT. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ para comparação com normoproteico; ## $p < 0,01$ e ### $P < 0,001$ para comparação com o grupo hipoproteico; Φ Φ $p < 0,01$, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

Já aos 14 dias após a confecção das lesões as áreas positivas detectadas apresentaram os seguintes resultados: na comparação do grupo normoproteico ($45,6 \pm 2,9$) com o grupo hipoprotéico ($81,23 \pm 7,34$) houve uma diferença estatística de ($p < 0,001$). Comparando o grupo normoproteico e o grupo normoproteico PBMT ($36,2,6 \pm 6,01$) não houve diferença estatística de ($p > 0,05$). Houve também uma diferença estatística de ($p < 0,001$) quando se compara o grupo hipoprotéico com grupo hipoprotéico PBMT ($63,2 \pm 5,87$) e normoproteico PBMT. Quando comparamos os dois grupos tratados

(normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT) obteve-se diferença estatística de ($p < 0,001$) (Figura 23 e 24).

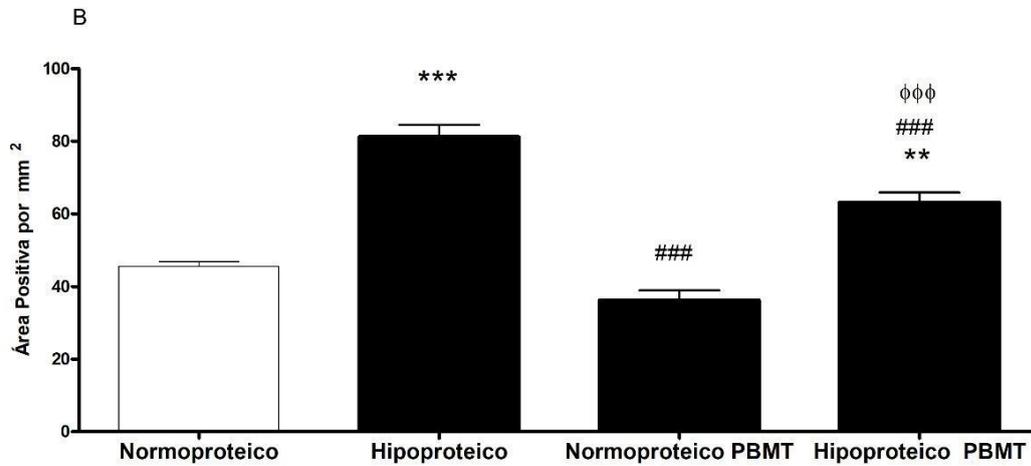


Figura 23. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-3 aos 14 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos: grupo normoproteico; grupo hipoproteico; grupo normoproteico PBMT; grupo hipoproteico PBMT. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparação com normoproteico; ### $P < 0.001$ para comparação com o grupo hipoproteico; Φ Φ Φ $p < 0,001$, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

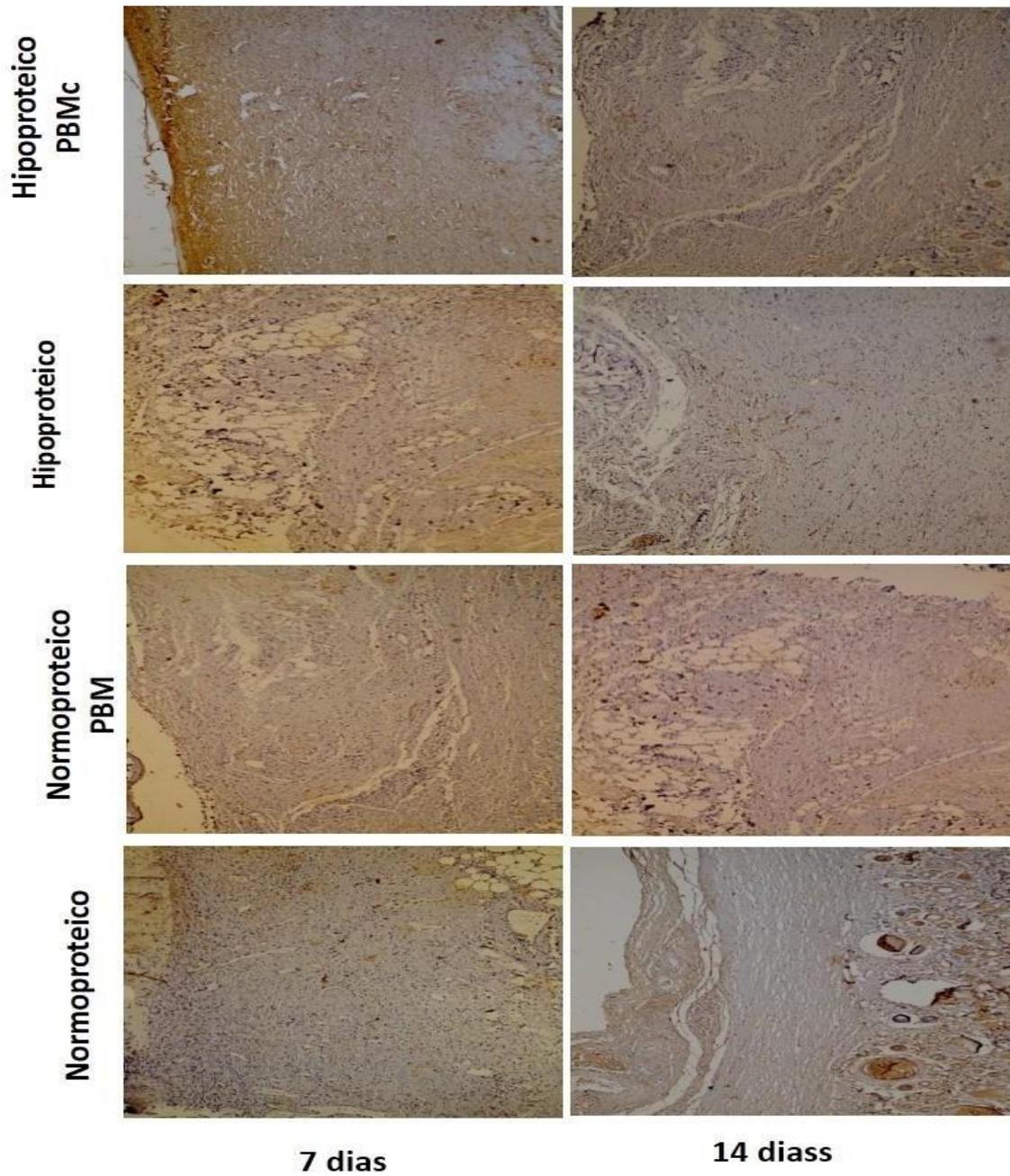


Figura 24. Representação das fotomicrografias obtidas dos cortes histológicos e submetidos a técnica de imuno-histoquímica para MMP-3, obtidas aos 7 e 14 dias após a confecção das lesões cutâneas em ratos normoproteicos e hipoproteicos tratados ou não com PBMT. Observar as áreas marcadas positivamente em marroz escuro, aumento de 40x.

5.5 Metaloproteinases de Matriz - 9 (MMP-9)

A imunorreatividade para MMP-9 foi quantificada usando áreas positivas detectadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5. Observou-se que 7 dias após a lesão, o grupo normoproteico ($72,00 \pm 5,51$), mostrou diferença estatística na comparação com o grupo experimental: grupo hipoprotéico ($95,4 \pm 9,3$), ($p < 0,001$); no cruzamento com o grupo normoproteico PBMT ($62,12 \pm 5,5$), e com o grupo hipoprotéico PBMT ($73,21 \pm 4,1$) não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Houve também diferença estatística ($p < 0,001$) na comparação do grupo hipoprotéico com os grupos normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT. Quando comparamos os dois grupos tratados (normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT) não houve diferença estatística de ($p > 0,05$). (Figura 25 e 27)

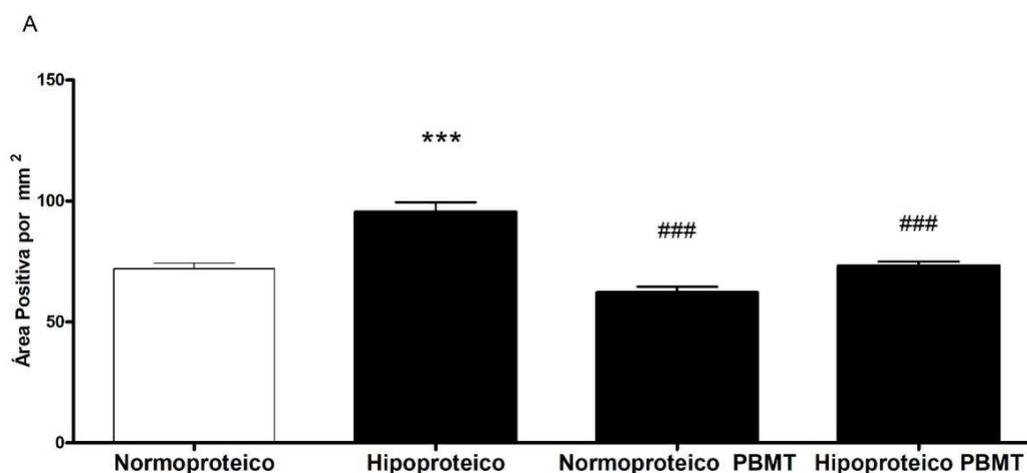


Figura 25. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-9 aos 7 dias após a confecção das lesão cutâneas, comparando dos grupos : grupo normoproteico; grupo hipotroteica; grupo normoproteico PBMT; grupo hipotroteico PBMT. *** $p < 0,001$ para comparação com normoproteico; ### $P < 0,001$ para comparação com o grupo hipoproteico. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

Aos 14 dias após a confecção das lesões as áreas positivas detectadas para MMP-9 apresentaram os seguintes resultados: na comparação do grupo normoproteico ($55,0 \pm 6,7$) com o grupo hipoprotéico ($71,4 \pm 5,7$) houve uma diferença estatística de ($p < 0,01$). Comparando o grupo normoproteico e o grupo normoproteico PBMT ($32,3 \pm 3,21$) houve diferença estatística de ($p > 0,001$). Já quando comparamos o grupo normoproteico com grupo hipoprotéico PBMT ($51,4 \pm 6,17$), não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$). Houve também diferença estatística de ($p < 0,001$) quando se compara o grupo hipoprotéico com grupo hipoprotéico PBMT ($51,4 \pm 6,17$) bem como com o normoproteico PBMT. Quando comparamos os dois grupos tratados (normoproteico PBMT e hipoprotéico PBMT) obteve-se diferença estatística de ($p < 0,001$). (Figura 26 e 27)

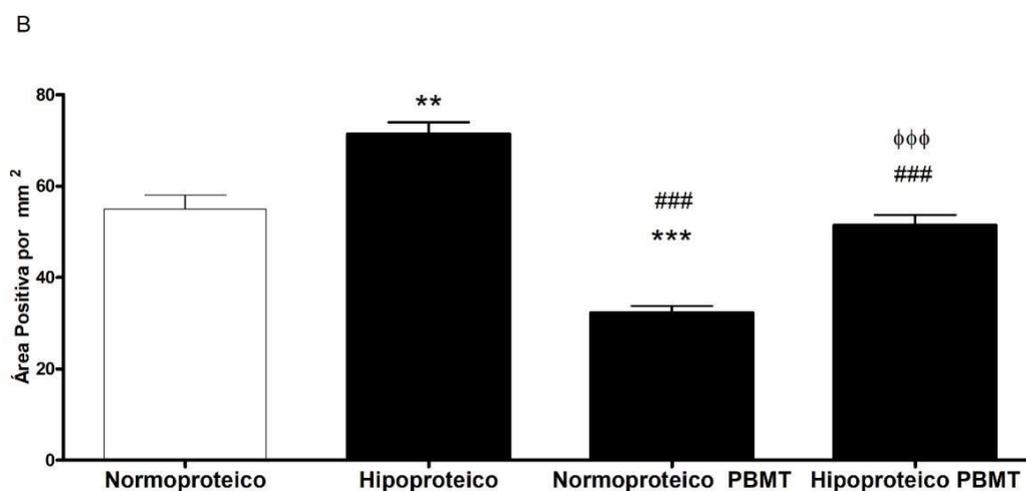


Figura 26. Representação gráfica das áreas positivas em mm² detectadas para imunorreatividade das MMP-9 aos 14 dias após a confecção das lesões cutâneas, comparando dos grupos : grupo normoproteico; grupo hipoproteico; grupo normoproteico PBMT; grupo hipoproteico PBMT. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparação com normoproteico; ### $P < 0,001$ para comparação com o grupo hipoproteico; Φ Φ Φ $p < 0,001$, na comparação entre os grupos normoproteico PBMT e hipoproteico PBMT. Foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para comparações. Os valores estão representados em média e desvios padrão (DP).

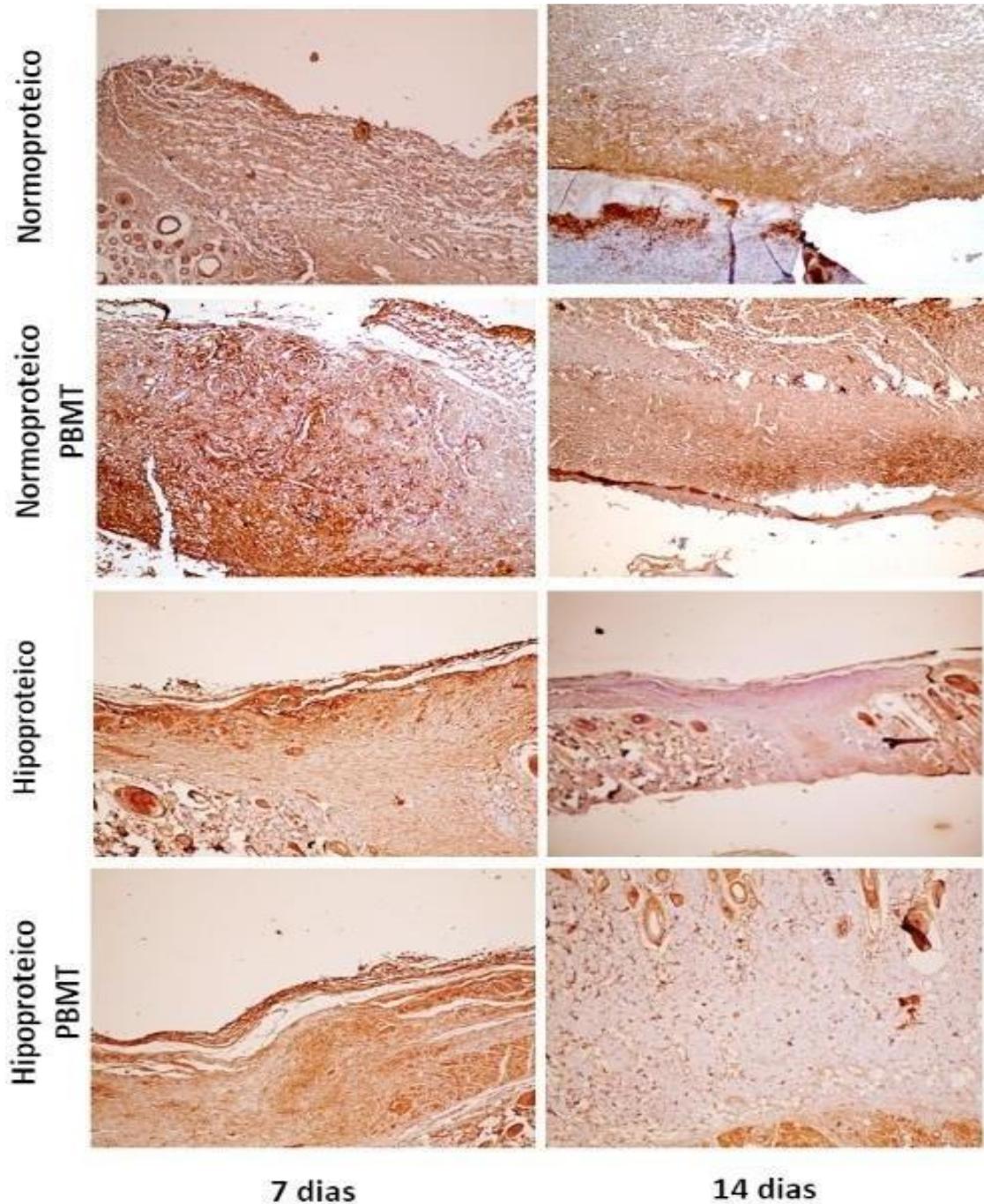


Figura 27. Representação das fotomicrografias obtidas dos cortes histológicos e submetidos à técnica de imuno-histoquímica para MMP-9, obtidas aos 7 e 14 dias após a confecção das lesões cutâneas em ratos normoproteicos e hipoproteicos tratados ou não com PBMT. Observar as áreas marcadas positivamente em marrom escuro, aumento de 40x.

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o processo de cicatrização de feridas em ratos submetidos à desnutrição protéica e tratados com PBMT em comparação com animais normoproteicos nas fases proliferativa e de maturação. Observamos que a resposta ao PBMT foi diferente nos casos de desnutrição em ratos; no entanto, o PBMT foi capaz de acelerar o processo de análise quando foi feita uma comparação entre animais desnutridos com e sem PBMT. Para tanto, foram realizados testes de resistência mecânica, investigação do colágeno depositado durante a cicatrização das feridas e a expressão imuno-histoquímica de MMP-3, MMP-9. Os experimentos foram realizados em dois momentos (7 e 14 dias) após a lesão cutânea, utilizando-se biópsia por *punch* em ratos normoproteicos e hipoprotéicos.

Os principais resultados deste estudo incluíram o seguinte: O comportamento do processo de reparo ocorreu diferentemente entre ratos normoproteicos e hipoprotéicos, com um atraso óbvio nos grupos hipoprotéicos, como verificado pela análise de colágeno tipos I e III. O grupo de normoprotéico tratado com PBMT mostrou um aumento na taxa de reparo da ferida em comparação com seu respectivo grupo sem tratamento; no entanto, o grupo hipoprotéicos PBMT ainda apresentava uma defasagem no reparo comparado ao grupo controle de normoproteínas, principalmente em relação à fase proliferativa e de maturação.

A cascata de cicatrização normalmente começa com um processo ordenado de hemostasia e deposição de fibrina, que leva a uma cascata de células inflamatórias, caracterizada por neutrófilos, macrófagos e linfócitos no

tecido. Isto é seguido por atração e proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno e, finalmente, remodelação por reticulação de colágeno e maturação da cicatriz ⁽¹⁰¹⁾.

Tais achados são confirmados por outros estudos que mostram que a desnutrição tem uma das características para promover o atraso do processo de reparo. A depleção de proteínas leva a uma fase inflamatória prolongada pela diminuição da proliferação de fibroblastos, síntese de proteoglicanos e neoangiogênese ⁽¹⁰²⁾, a contração da ferida é difícil, e a matriz celular é pobre e com baixa deposição de colágeno. Esses achados estão de acordo com outros estudos que demonstram que o PBMT acelera e melhora o processo de reparo ^{(103) (104)} tanto em condições normais ^{(105) (106) (107)} quanto em condições adversas como diabetes e outras doenças ^{(108) (109) (110)}. Nossos resultados estão de acordo com RASHIDI et al. (2015) ⁽¹¹¹⁾ quando descrevem que os principais efeitos fisiológicos e celulares da interação laser-tecido são a modulação da proliferação celular, motilidade celular, ativação de fagócitos e macrófagos, estimulação de respostas imunes, aumento do metabolismo celular, modulação da proliferação de fibroblastos, alteração dos potenciais de membrana celular, estimulação da angiogênese, alteração dos potenciais de ação e alteração da produção endógena de opioides.

Na cicatrização de feridas, a produção excessiva de enzimas proteolíticas produzidas pelos macrófagos leva à redução das quantidades de fatores de crescimento e à destruição sucessiva da matriz extracelular ^{(112) (113)}. Eles são atores-chave em todas as fases do processo de cura: remodelam o tecido de granulação, provavelmente controlam a angiogênese e regulam a atividade de alguns fatores de crescimento ⁽¹¹⁴⁾. No entanto, o processo

proteolítico liberado pelos macrófagos também pode levar à destruição do tecido patológico ⁽¹¹⁵⁾. Este processo é dependente de MMPs secretadas por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, cuja atividade é controlada por inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). [35]

Também realizamos uma análise de expressão imuno-histoquímica de MMP-3 e MMP-9, pois interferem diretamente na deposição e no processo proteolítico do colágeno, alterando todas as propriedades mecânicas deste. Nossos achados mostram que no grupo de normoproteínas houve um balanço entre a quantidade de colágeno e MMP3 e 9. No entanto, no grupo hipoprotéico este equilíbrio não foi encontrado com uma super-expressão de MMP-1 e MMP-9 ocorrendo 7 a 14 dias após a prejuízo. Também observamos que nos dois tempos experimentais os animais tratados com PBMT apresentaram uma regulação negativa das MMPs 3 e 9. Esses achados estão de acordo com os resultados apresentados anteriormente por Fiorio *et al* ⁽¹¹⁶⁾ e Rambo *et al* ⁽¹¹⁾, embora o objeto de estudo fosse o envelhecimento. Os resultados de Silva *et al* ⁽¹¹⁷⁾ com lesões cutâneas em ratos diabéticos demonstraram que uma PBMT foi capaz de promover uma MMP2 negativa e MMP9, além de aumentar a deposição de colágeno.

Ayuk *et al* ⁽¹¹⁸⁾ em estudo envolvendo a MEC in vitro, com genes em um modelo de células diabéticas feridas, constatou-se que PBMT alterou 49 genes na maioria das vezes regulados negativamente, dentre os quais MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP- e MMP -16.

Nos estágios iniciais de feridas, cicatrização, fibroblastos dérmicos preenchem a ferida com primariamente Colágeno Tipo III, enquanto os estágios tardios são dominados pela produção de Colágeno Tipo I. Conforme a ferida é

resolvida, a ultraestrutura do colágeno se torna mais refinada à medida que o colágeno aumenta a fibrilação, (tamanho), sofre interligação e desenvolve uma orientação de tecido semelhante à pele normal ⁽¹¹⁹⁾.

O colágeno dérmico numa base por peso aproxima-se da resistência à tração do aço; no tecido normal, é uma molécula forte e altamente organizada. Em contraste, as fibras de colágeno formadas no tecido cicatricial são muito menores e têm aparência aleatória; O tecido cicatricial é sempre mais fraco e se rompe antes do tecido normal circundante. A força de tensão recuperada em uma ferida nunca se aproximará do normal. De fato, a resistência à tração máxima que uma ferida pode atingir é de aproximadamente 80% da pele normal.

Nossos achados também mostram que a diminuição da deposição de colágeno e aumento da expressão das metaloproteinases podem estar relacionadas a importantes alterações na matriz extracelular no grupo que recebeu dieta hipoproteica, uma deposição ineficiente de fibras colágenas leva, conseqüentemente, à formação de uma cicatriz fina e frágil. Tais achados mostraram que a administração da dieta hipoproteica retardou a deposição de colágeno tipo I e tipo III, prejudicando a migração celular e a síntese e remodelação das fibras. Os resultados das imagens de birefringência obtidas pela microscopia por luz polarizada do colágeno marcado por *Picro Sirius Red* também sugerem que, além de diminuir a densidade, também houve ausência de alinhamento das fibras colágenas, o que levou ao comprometimento das propriedades biomecânicas do tecido durante os testes de ensaios mecânicos, outro achado a ser considerado foi a espessura das amostras que eram nitidamente mais finas nos animais que compuseram o grupo hipoproteico.

Essas alterações estão associadas à formação de uma cicatriz mais frágil e menos resistente ao estresse por tração do que nos grupos normoproteicos .

No período subsequente (quatorze dias – fase de remodelação) , a resistência da cicatrização cutânea de todos os grupos foi organizada, e não houve diferença estatística entre os grupos, com relação a deformação durante o ensaio mecânico. Porém tanto o grupo normoproteico considerado controle como ambos os grupos (normoproteico e hipoproteico), tratados com a PBMT, apresentaram diferenças marcantes quando comparados com o grupo hipoproteico sem nenhum tratamento tanto na Força máxima - Fmax como na deformação máxima - Dmax, a pele dos animais do grupo hipoproteico PBMT era mais resistente a tração aplicada do que as do grupo hipoproteico sem tratamento e sua deformação era mais lenta. A fase de remodelação é a última etapa no processo de cicatrização e é caracterizada por um aumento no tecido de resistência biomecânica devido à substituição do tecido de granulação rico em colágeno tipo III pelo tecido mais forte, rico em colágeno tipo I ⁽¹²⁰⁾.

Segundo Gonzaga et al. (2009) ⁽¹²¹⁾, O PBMT estimula a deposição de fibras de colágeno nos estágios finais da cicatrização de feridas. Essa melhora da deposição de colágeno promovida pela PBMT pode estar intimamente relacionada ao fato de que a PBMT é capaz de supra regular a liberação de algumas citocinas responsáveis pela proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, como FGF- β e TGF, respectivamente.

Além disso, tem sido sugerido ⁽¹²²⁾ que o PBMT aumenta a síntese de ATP e, conseqüentemente, a atividade enzimática da célula. Assim, parece racional supor que a PBMT por laser de baixa intensidade possa regular

positivamente a atividade de enzimas responsáveis pela síntese de fibras de colágeno.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a fotobiomodulação quando aplicadas sobre feridas cutâneas induzidas em ratos desnutridos, foi eficaz na fase de proliferação no tratamento.

A de quantidade na imunomarcação de MMP3 analisadas, apresentaram uma maior regulação em sua quantidade aos 7 dias do que aos 14 dias. As MMP9 apresentaram bons índices aos 7 e aos 14 dias apresentando maior aproximação aos níveis do grupo controle.

Analisado por microscopia de luz polarizada a quantidade de colágeno aos 7 dias, os apresentou um resultado expressivo no aumento da quantidade de colágeno tipo III e regulação da quantidade de colágenos tipo I. Aos 14 dias não foram observadas evidências suficientes de que ocorreu regulação na quantidade de colágeno tipo I e colágeno III.

As análises realizadas aos 7 dias nas propriedades mecânicas do tecido cicatricial avaliado por meio de máquina universal de ensaio, a elasticidade e resistência do tecido equiparou-se ao grupo controle, aos 14 dias o tecido não apresentou melhora em sua resistência quando comprado ao grupo controle.

Mais estudos clínicos são necessários para confirmar esses achados em contextos clínicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015: p. 370-8.
2. Shimizu T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *J Dermatol Sci*. 2005 37(2):65-73.
3. Li J CJKR. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007 Jan-Feb; 25(1): 9-18.
4. Singer AJ CR. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10): 738-46.
5. Broughton G JJAC. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S.
6. Murdoch C FA. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000 May 15; 95(10): 3032-43.
7. Dipietro LA RMLQLBGR. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen*. 2001 Jan-Feb;9(1):28-33.
8. Lee JH HLSBKREK. Does Risk for Malnutrition in Patients Presenting With Fractures Predict Lower Quality Measures? *J Orthop Trauma*. 2015: p. 373-8.
9. Oliveira AG BPSAORSMLMSMTBPMVEVRC. Influence of the nutritional status in the clinical and therapeutical evolution in adults and elderly with American Tegumentary Leishmaniasis. *Acta Trop*. 2013: p. 36-40.
10. Burkiewicz CJ GFSTdNMSSdSG. Vitamin D and skin repair: a prospective, double-blind and placebo controlled study in the healing of leg ulcers. *Rev Col Bras Cir*. 2012 Sep-Oct; 39(5): 401-7.
11. de Melo Rambo CS1 SJJSAVAVRARLJEdTCdCP. 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.
12. Alves AC VRLJEdSSLAARJJdCP. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and

macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(5): R116.

13. Esmaeelinejad M BMDHBMMN. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. *Lasers Med Sci.* 2014; Jan; 29(1): 121-9.
14. Guidugli Neto J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. *Rev Odontol Univ Sao Paulo.* 1987 Oct-Dec; 1(4): 6-8.
15. Wedlock P SRLCMF. Analgesic effects of cranial laser treatment in two rat nociception models. *Physiol Behav.* 1996 Mar; 59(3): 445-8.
16. Tatmatsu-Rocha JC FCHMDMFdNNDPPN. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B.* 2016 ; Nov; 164: 96-102.
17. Engel KW KIAP. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. *J Biophotonics.* 2016 ; Dec; 9(11-12): 1148-1156.
18. Silveira IRAPAE SM. Efeitos da dieta na cicatrização de fratos do fêmur imobilizados com pinos intramedulares em cão. *Acta Cirurgica Brasileira.* 1997; vol. 12, não. 3, pp. 178-181. [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865019970.\(\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865019970.().).
19. Ihemelandu C. Número de fibras e tamanhos do músculo sóleo do sol na desnutrição protéica pós-natal precoce.. *Acta Anatomica.* 1995; vol. 121, não. 2, pp. 89-93. <http://dx.doi.org/10.1159/000145949>. PMID: 3976346.
20. Díaz-Cintra S,GMA,MMAA,CLePAR. A desnutrição protéica altera diferencialmente o número de interneurônios de descarboxilase de ácido glutâmico-67 em gyrus dentado e subcampos CA1-3 do hipocampo dorsal. *Experimental Neurology.* 2007; vol. 208, no. 1, pp. 47-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.07.003> . PMID: 17706195.
21. Morgane PMDeGJ. Efeitos da desnutrição protéica pré-natal na formação do hipocampo. *Neurociências e Biobehavioral Reviews.* 2002.; vol. 26, não. 4, pp. 471-483. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00012-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00012-X). PMID:().

22. Demir MV TACHUIYSEU. Nutritional status and laboratory parameters among internal medicine inpatients. Niger J Clin Pract. 2015 18(6): 757-61.
23. Infância. FdNUpa. UNICEF. 2001; Nova York, NY.
24. Nutrição CAdNUpoSdCd. Quarto Relatório sobre a Situação Mundial da Nutrição. 2000.
25. PS. S. Adaptação à ingestão de baixa energia: as respostas e limites para o baixo consumo de lactentes, crianças e adultos.. Eur J Clin Nutr. 1999; 53 : S14-S33.
26. Chaves A BJHAMOTH. A biologia da fome humana. Imprensa da Universidade de Minnesota: Minneapolis. 1950..
27. Ferro-Luzzi A CPKRKA. Metabolismo basal de homens e mulheres cronicamente desnutridos, estáveis ao peso: falta de adaptação metabólica e diferenças étnicas. Am J Clin Nutr. 1997; ; 66 : 1086-1093.
28. Soares MJ PLSPJAWJ. Rotatividade de proteínas no corpo inteiro em indivíduos cronicamente desnutridos. Clin Sci. 1994; 86 : 441-446.
29. MacKay D., Miller A. Suporte nutricional para cicatrização de feridas. Altern.. Med. Rev. 2003; 8 , 359-377.
30. Cunniffe G, Dickson G, Partap S., Stanton K, O'Brien F. Desenvolvimento e caracterização de uma estrutura composta de nano-hidroxiapatita de colágeno para engenharia de tecido ósseo.. J. Mater. Sci. Mater. Med.. 2010; 21 , 2293-2298.
31. Gross R. O efeito do ascorbato na cicatrização de feridas. Int. Oftalmol. Clin.. 2000; 40 , 51-57.
32. Clark R. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. J Am Acad Dermatol. 1985 Nov;13(5 Pt 1):701-25.
33. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997 Apr 4; 276(5309): 75-81.
34. Takamiya M SKAY. Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds. Am J Forensic Med Pathol.. 2002; Sep; 23(3): 264-7.

35. Baum CL AC. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005 Jun; 31(6): 674-86; discussion 686.
36. Lefkovits J PETE. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 1995 Jun 8; 332(23): 1553-9.
37. Willerson J. Conversion from chronic to acute coronary heart disease syndromes. Role of platelets and platelet products. *Tex Heart Inst J.* 1995 22(1): 13-9.
38. Kondo T OT. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med.* 1996; 108(5): 231-6.
39. Foxman EF CJBE. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1; 139(5): 1349-60.
40. Engelhardt E TAGMDSBEGR. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998 Dec; 153(6): 1849-60.
41. Brandt E PFLAEJBLFH. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol.* 2000; Apr; 67(4): 471-8.
42. Knighton DR SIHT. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery.* 1981 Aug;90(2):262-70.
43. Eckersley JR DH. Wounds and wound healing. *Br Med Bull.* 1988; Apr; 44(2): 423-36.
44. Gabbiani G RGMG. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971 May 15;27(5):549-50.
45. DiPietro LA PPRSKE. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol.* 1995 Apr; 146(4): 868-75.
46. Meesters DM WKBPPM. Malnutrition and Fracture Healing: Are Specific Deficiencies in Amino Acids Important in Nonunion Development?

Nutrients.. 2018; Oct 31; 10(11).

47. Emery PW SP. Os efeitos da restrição dietética na síntese de proteínas e cicatrização de feridas após a cirurgia no rato. Clin Sci. 1995; 89 : 383-388.
48. TT. I. Efeitos da desnutrição e hiperalimentação na cicatrização de feridas. Surg Gynecol Obstet. 1978; 146 : 33-37.
49. Cereda E NJCRRMSJ. Efficacy of a Disease-Specific Nutritional Support for Pressure Ulcer Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Nutr Health Aging. 2017 21(6): 655-661.
50. Waterlow JC GPDdM. otatividade de proteínas em tecidos de mamíferos e no corpo inteiro. R Holanda do Norte: Amsterdã. .
51. Garlick PJ MMPV. Uma técnica rápida e conveniente para medir a taxa de síntese de proteínas em tecidos, por injeção de 3 H-fenilalanina. Biochem J . 1980; 192 : 719–723.
52. Emery PW SP. Os efeitos da restrição dietética na síntese de proteínas e cicatrização de feridas após a cirurgia no rato. Clin Sci. 1995; 89 : 383-388.
53. Philipp EE BJNM(. Metabolismo proteico durante a gravidez. . Fundamentos Científicos da Obstetrícia e Ginecologia . Heinemann: London, 1977; ; pp 503-510.
54. Blass SC GHBCTRSWBSPES. Extracellular micronutrient levels and pro-/antioxidant status in trauma patients with wound healing disorders: results of a cross-sectional study. Nutr J. 2013 Dec; 12(1): 157.
55. Kalava UR CSTP. Association between vitamin D and pressure ulcers in older ambulatory adults: results of a matched case-control study. Clin Interv Aging. 2011. 2011 6: 213-9.
56. Legendre C DCMSLCGJSP. Impact of protein deficiency on venous ulcer healing. J Vasc Surg.. 2008; Sep;48(3):688-93.
57. Jewell L GRQACLGW. Rate of healing in skin-grafted burn wounds. Plast Reconstr Surg.. 2007; Aug; 120(2): 451-6.
58. Runström B HONPSROG. Outcome of 132 consecutive reconstructive operations for intestinal fistula--staged operation without primary

anastomosis improved outcome in retrospective analysis. *Scand J Surg.* 2013 102(3):152-7.

59. T K. High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy. *Lasers Surg Med.* 2004: p. 298-9.
60. Chung H DTSSHYCJHM. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012; Feb; 40(2): 516-33.
61. Karu TI AN. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk.* 1995: p. 693-5.
62. Karu TI KS. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005: p. 23(4).
63. T K. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999: p. 1-17.
64. Vladimirov YA OAKG. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc).* 2004 Jan; 69(1): 81-90.
65. Sutherland J. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol.* 2002 76(2):164-70.
66. Pagès JC GMMED. Principles of physics and application of the laser in plastic surgery. *Rev Med Suisse Romande.* 1999: p. 739-42.
67. Hawkins D AH. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006 24(6): 705-14.
68. Passarella S CEMSPDQECICA. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 1984: p. 95-9.
69. Greco M GGPEMEQE. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 163(3): 1428-34.
70. Lubart R EMLRFHSA. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005: p. 3-9.
71. Shiva S GM. Shining a light on tissue NO stores: near infrared release of

- NO from nitrite and nitrosylated hemes. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 46(1):1-3.
72. Lane N. Cell biology: power games. *Nature.* 2006: p. 901-3.
73. Stadler I ERKBNJNVBNLR. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med.* 2000 27(3):255-61.
74. Reddy GK SBLEC. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1988 22(5):281-7.
75. Gupta A KGYAGSCSSABSS. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics.* 2015 8(6):489-501.
76. Channual J1 CBOKPDLJJK. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. *Lasers Surg Med.* 2008 Nov; 40(9): 644-50.
77. Rocha Júnior AM VBdALAF. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009; Apr; 27(2): 303-7.
78. Cury V MAALBPCJSNCFRdSHHMPN. 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.
79. Feng J ZYXD. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell Signal.* 2012 24(6): 1116-25.
80. Israfilova SB GÉ. Improved results of the trachea scar stenosis treatment by inclusion in the complex therapy of combined application diprospan and low-intensity infrared laser radiation. *Klin Khir.* 2013 Sep;(9): 47-9.
81. Aykol G BUMIKZOUTKSAEIHYF. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol.* 2011; Mar ;82(3): 481-8.
82. Paschoal MA SPL. Therapeutic effects of low-level laser therapy after premolar extraction in adolescents: a randomized double-blind clinical trial. *Photomed Laser Surg.* 2012: p. 559-64.

83. Pinto FC CMPNAEYEMHKVMTM. Novel treatment immediately after myelomeningocele repair applying low-level laser therapy in newborns: a pilot study. *Pediatr Neurosurg*. 2010 46(4):249-54.
84. Pinto NC PMSNCM. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: therapeutic proposal. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009 24(1):88-91.
85. Kaviani A DGAFLFMGMSMZKNLNB. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report. *Photomed Laser Surg*. 2011: p. 109-14.
86. Feitosa MC CAFVCIORAE. Effects of the Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the process of healing diabetic foot ulcers. *Acta Cir Bras*. 2015 30(12): 852-7.
87. Dahmardehei M KNVRMSMMNMAFAA. Effects of low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. *Lasers Med Sci*. 2016 31(3): 497-502.
88. R. G. Inflamação na pele humana: um modelo para estudar a migração de leucócitos mediada por quimiocinas in vivo. *J Pathol*.. 2001 Ago; 194 (4): 393-4.
89. Medrado AP SASERSAZ. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*.. 2008 Sep 18; 92(3):144-52.
90. Holm-Pedersen P VA. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg*.. 1972; 6(1):24-35.
91. Oxlund H FIVA. The influence of cortisol on wound healing of the skin and distant connective tissue response. *Surg Gynecol Obstet*.. 1979 Jun; 148(6):876-80.
92. Kjaer M1 LHHKBMHMHLD SKMKMMS. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scand J Med Sci Sports*.. 2009 Aug; 19(4):500-10. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.00986.x.
93. Jorgensen LN 1 KF,Kt,GF. Redução do acúmulo de colágeno após uma

- grande cirurgia. Br J Surg. Novembro de 1996 ; 83 (11): 1591-4. 1996; 83 (11): 1591-4.
94. Yin Q SZGSWXSSMY. Repair of large tibial bone and soft tissue defects by shortening-lengthening method. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2013 Dec;27(12):1462-5. 2013 Dec; 27(12):1462-5.
 95. Marcos RL AGMVRRMJLMR. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. J Mech Behav Biomed Mater.. 2014 Jan; 29:272-85. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.08.028. Epub 2013 Sep 9.
 96. You C WXZYHC. Three types of dermal grafts in rats: the importance of mechanical property and structural design. Biomed Eng Online. 2013 Dec 4; 12:125. doi: 10.1186/1475-925X-12-125.
 97. Wang X CLWY1,CG2. Interação de agentes clássicos da platina com as proteínas Atox1 monoméricas e diméricas: um estudo de simulação de dinâmica molecular. Int J Mol Sci.. 2013; ; Int J Mol Sci. 20 de dezembro de 2013 ; 15 (1): 75-99. doi: 10.3390 / ijms15010075.
 98. Garcia Y WBCRGMPA. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. Biomaterials.. 2008 Mar; 29(7):857-68. Epub 2007 Nov 26.
 99. Villalon L TBYI. Low protein diets potentiate lithocholic acid-induced cholestasis in rats. J Nutr.. 1992 Jul; 122(7):1587-96.
 100. Pocino M MI. Affinity and distribution of subpopulations of antibody-producing cells in protein-restricted C57BL/6 mice. Cell Immunol.. 1984 Nov; 89(1):169-85.
 101. Guo S DL. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010 89(3): 219-29.
 102. Arnold M BA. Nutrition and wound healing.. Plast Reconstr Surg.. 2006 Jun; 117(7 Suppl):42S-58S.
 103. 22. Roy M,PJA,&CKM(NatPSPIaPCParsGo. ; doi:10.1097/GOX.0000000000001704.
 104. Kresse H SE. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control.. J Cell Physiol.. 2001 Dec; 189(3):266-74.

105. Gibson DJ,&SGS. Molecular Wound Assessments: Matrix Metalloproteinases. *Advances in wound care*. 2013; 92(1), 18–23. doi:10.1089/wound.2011.035.
106. Saldaña L CLBFAMVNMfrscrtstJBMRA. 2014 Jan; 102(1):128-40. doi: 10.1002/jbm.a.34674.
107. Darby IA, LB, BF, & DA. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014; 7, 301–311. doi:10.2147/CCID.S50046.
108. Shipley JM, WRL, KDK, LTJ, & SSD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1996.
109. Miller SA DHGS. Cholesterolemia and cardiovascular sudanophilia in rats fed sardine mixtures. *J Nutr*. 1962 ; Aug; 77(4): 397-402.
110. Posten W WDDJAKSSAM. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy.. *Dermatol Surg*. 2005 Mar; 31(3):334-40.
111. Avci P GASMVDPZPNHM. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*.. 2013 Mar; 32(1):41-52. PubMed PMID: 24049929; PubMed Central PMCID: PMC4126803.
112. Solmaz H UYGM. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation.. *Lasers Med Sci*. 2017 May; ; 32(4):903-910. doi: 10.1007/s10103-017-2191-0.
113. Solmaz H DSGMUY. Laser biostimulation of wound healing: bioimpedance measurements support histology. *Lasers Med Sci*.. 2016 Nov.; 31(8):1547-1554.
114. Feehan J BSCLCAMKAVHMKD. Therapeutic applications of polarized light: Tissue healing and immunomodulatory effects.. *Maturitas*. 2018 Oct; 116:11-17. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.07.009.
115. Bagheri M AAAMGSPAPRCSDSRFBM. Effects of Photobiomodulation on Degranulation and Number of Mast Cells and Wound Strength in Skin Wound Healing of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Photomed*

Laser Surg. 2018 Ago; 36 (8): 415-423. doi: 10.1089 / pho.2018.4453.

Epub 2018 6 de jul.

116. Fiorio FB DSSdMRCDCSAdMBLJEdCP. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov; 32(8):1769-1782. doi: 10.1007/s10103-017-2254-2. Epub 2017 Jul 5.
117. Da Silva A LJEARCDSSVRDCPT. 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; 15(4):210-216. .
118. Ayuk SM AHHN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J Diabetes Res.* 2016; 2016:2897656. doi: 10.1155/2016/2897656. Epub 2016 May 23. PubMed PMID: 27314046; PubMed Central PMCID: PMC4893587.
119. Ayuk SM HNAH. Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660 nm.. *Diabetes Technol Ther.* 2012 Dec; ; 14(12):1110-7. doi: 10.1089/dia.2012.0125.
120. Sarandy MM,NRD,XAA,VCE,LJ,MF,&GRV. Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 9538351. doi: 10.1155 / 2017/9538351. Epub 2017 13 de setembro.
121. Gonzaga Ribeiro MA dARBA dOVTDC. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation.. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(3):390. doi: 10.4103/0970-9290.57360.
122. de Freitas LF,&HMR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *Lasers and Electro-optics Society.* 2016; 22(3), 7000417. doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201.
123. Zubair M1 MAMDAJ. 25-Hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels and diabetic foot ulcer: is there any relationship? *Diabetes Metab Syndr.* 2013 Jul-Sep; 7(3): 148-53..

124. Wang Y HYWYLPHM. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Feb; 1861(2): 441-449..
125. Walker MD RSBGHDLA. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med.* 2000 26(1):41-7.
126. Vargas G CEBJRH3WA. Use of an agent to reduce scattering in skin. *Lasers Surg Med.* 1999 24(2):133-41.
127. Vargas G CEBJRH3WA. Use of an agent to reduce scattering in skin. *Lasers Surg Med.* 1999 24(2):133-41.
128. Tuby H MLOU. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007 Apr;39(4):373-8. 2007 39(4):373-8.
129. Tiwari S PDGSSS. Vitamin D deficiency is associated with inflammatory cytokine concentrations in patients with diabetic foot infection. *Br J Nutr.* 2014 112(12):1938-43.
130. Stein A BDMLOU. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005 23(2):161-6.
131. Sanz-Moliner JD NJCRCS. The effect of an 810-nm diode laser on postoperative pain and tissue response after modified Widman flap surgery: a pilot study in humans. *J Periodontol.* 2013 84(2):152-8..
132. Pinto NC PMSNCM. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: therapeutic proposal. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009; 24 (1): 88-91.
133. Norgren L HW,DJ,NM,HK,FF, Grupo de Trabalho TASC II BK,CJ,DZI,KK,LJ,LC,NS,RM,RJ,SN,SH,SM,B. Consenso Inter-Sociedade para o Tratamento da Doença Arterial Periférica (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007: p. S1-75.
134. Minatel DG FMFSEC. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers Surg Med.* 2009:

p. 433-41.

135. Busnardo VL BSM. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. *Rev Bras Fisioter.* 2010 Jan-Feb; 14(1): 45-51.
136. Castano AP DTYICRAWSMHM. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg Med.* 2007 Jul; 39(6): 543-50.
137. Gaudiani JL1 SAMP. Low prealbumin is a significant predictor of medical complications in severe anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 2014 47(2): 148-56.
138. D'Souza SJ PABKDL. Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):23531-8.
139. Reddy GK SBLEC. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2001; May-Jun; 9(3): 248-55.
140. Greenhalgh D. Management of the skin and soft tissue in the geriatric surgical patient. *Surg Clin North Am.* 2015 95(1): 103-14.
141. Davies M. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation.* 1990; Sep; 82(3 Suppl): II38-46.
142. Clark R. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol.* 1985; Nov; 13(5 Pt 1): 701-25.
143. Clark R. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol.* 1985; Nov ;13(5 Pt 1): 701-25.
144. Rogers QR HA. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J Nutr.* 1965; Nov; 87(3): 267-73.
145. Fioretto JR QSPCMLOKMB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; Apr; 282(4): H1327-33.
146. Ge KeCS. Definição e mensuração da desnutrição infantil.. *Ciências Biomédicas e Ambientais.* 2001; vol. 14, não. 4, pp. 283-291. PMID: 11862608.
147. Skinner SM GJWPSR. A preliminary study of the effects of laser radiation

- on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996; 41(3):188-92.
148. Woodruff LD BJBWDJKBCWDea. The efficacy of laser therapy in wound repair: a metaanalysis of the literature. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22(3):241-7.
149. Pugliese LS MARSAZdA. The influence of low level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers.. *Pesqui. Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13. 2003; 17(4):307-13.
150. Hawkins D HNAH. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing.. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1056:486-93.
151. Silveira PC SEPR. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy.. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86(3):279-82.
152. Reis SR MAMAFCLKL. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4):307-13.
153. Corazza AV JJKCBV. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2):102-6.
154. Hawkins DH AH. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation.. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(1):74-83.
155. Lamaro-Cardoso A BMMJFMMAAVVMLJR. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2019 May; 194:174-182. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.04.003. Epub 2019 Apr 10.
156. Otterço AN AABPPKAHPN. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018 Jun; 183:22-29. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.010. Epub 2018 Apr 8.
157. Iyomasa MM LJREÍJDFWIID. Ultrastructure and light microscope analysis of intact skin after a varying number of low level laser irradiations in mice.

Biomed Res Int.. 2014; 2014:506051. doi: 10.1155/2014/506051. Epub 2014 Jan 29.

158. Gonçalves RV SMdMSNRPM. Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of Brassica oleracea on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. Pathol Res Pract. 2013 Oct. 2013 Oct; 209(10):648-53. doi: 10.1016/j.prp.2013.07.006. Epub 2013 Jul 31.(Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of Brassica oleracea on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study.).
159. Eslami H MPSESM. Evaluation effect of low level Helium-Neon laser and Iranian propolis extract on Collagen Type I gene expression by human gingival fibroblasts: an in vitro study. Laser Ther. 2017 Jun 30; 26(2):105-112. doi: 10.5978/islsm.17-OR-8.
160. de Jesus PD SSTA. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies. J Biophotonics. 2016 Dec; 9(11-12):1189-1198. doi: 10.1002/jbio.201500288. Epub 2016 Mar 15.
161. Da Ré Guerra F VCOLMPdSAMPE. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. Lasers Med Sci.. 2016 May; 31(4):759-66. doi: 10.1007/s10103-016-1918-7. Epub 2016 Mar 16.
162. Trajano ET1 dTLDSSMVNdPLdFAMACA. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. Lasers Med Sci.. 2015 May; 30(4):1297-304. doi: 10.1007/s10103-015-1729-2. Epub 2015 Mar 7.
163. Martignago CC1 ORPODOPPSCMPPFR. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. Lasers Med Sci. 2015 Jan; 30(1):203-8. doi: 10.1007/s10103-014-1644-y. Epub 2014 Aug 30.(Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice.).
164. Paraguassú GM XFCMRMCPdSJPARL. Effect of laser phototherapy (λ 660 nm) on type I and III collagen expression during wound healing in hypothyroid rats: an immunohistochemical study in a rodent model.

Photomed Laser Surg.. 2014 May; 32(5):281-8. doi: 10.1089/pho.2013.3604. Epub 2014 Apr 14.

165. Fiório FB ARLJEdCPT. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan; 29(1):313-9. doi: 10.1007/s10103-013-1341-2. Epub 2013 May 16.
166. Aparecida Da Silva A LJEAARCDSSVRDCPT. 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. doi: 10.3109/14764172.2012.761345. Epub 2013 Mar 6.
167. Ayuk SM AHHN. Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro. *J Biophotonics.* 2018 Mar;11(3). doi: 10.1002/jbio.201700127. Epub 2017 Nov 8. 2018 Mar; 11(3). doi: 10.1002/jbio.201700127. Epub 2017 Nov 8.
168. de Souza TO1 MDFRDSPDJCLBSFKMM. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2011 Nov; 26(6):803-14. doi: 10.1007/s10103-011-0951-9. Epub 2011 Jul 15.
169. Maligieri LAO NLdMDDRdAAPEdAMEMDSGMF. Differing energy densities with laser 670nm InGaP controls inflammation and collagen reorganization in burns. *Burns.* 2017 Nov; 43(7):1524-1531. doi: 10.1016/j.burns.2017.04.008. Epub 2017 Aug 1.
170. Yang J WSDLAXLYLJTYTJ. Skin healing and collagen changes of rats after fractional erbium:yttrium aluminum garnet laser: observation by reflectance confocal microscopy with confirmed histological evidence. *Lasers Med Sci.* 2016 Aug; 31(6):1251-60. doi: 10.1007/s10103-016-1983-y. Epub 2016 Jun 8.
171. Melo VA ADAJRMDCF. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2011 Apr;26(2):129-34. Apr; 26(2):129-34.
172. Ye X WLDYLBZD. Investigation of the 1064nm Q-switched Nd:YAG laser on collagen expression in an animal model. *Photomed Laser Surg.* 2012

Oct; 30(10):604-9. doi: 10.1089/pho.2012.3221. Epub 2012 Sep 13.

173. Sassoli C CFSRTAIENDGMZOS. Low intensity 635 nm diode laser irradiation inhibits fibroblast-myofibroblast transition reducing TRPC1 channel expression/activity: New perspectives for tissue fibrosis treatment. *Lasers Surg Med.* 2016 Mar;48; (3):318-32. doi: 10.1002/lsm.22441. Epub 2015 Dec 10.
174. Gupta A KGYAGSCS,SA,BSS. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics.* 2015 Jun; 8(6):489-501. doi: 10.1002/jbio.201400058. Epub 2014 Sep 10.
175. Wiegand C SUAMRPKMHU. Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro.1. *Arch Dermatol Res.* 2010 Aug; 302(6):4.
176. Guo S,&DLA. Factors affecting wound healing.. *Journal of dental research.* 2010; 89(3), 219–229. doi:10.1177/0022034509359125.
177. Roy M,PJA,&CKM. Nutrition and the Plastic Surgeon: Possible Interventions and Practice Considerations. *Plastic and reconstructive surgery.* Global open. 2018; 6(8), e1704. doi:10.1097/GOX.0000000000001704.
178. Saldaña L CLBFAMVN. Mechanical forces regulate stem cell response to surface topography. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Jan Jan; 102(1):128-40. doi: 10.1002/jbm.a.34674.
179. Muller M,TC,LB,MF,HS,&BPY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association.* 2008; 25(4), 419–426. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02414.x.
180. FA. AW. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb; 27(1):127-35. doi: 10.1089/pho.2008.2406.
181. FA. AW. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing.. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb; 27(1):127-35. doi:

10.1089/pho.2008.2406.