



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



**Dominique Cavalcanti Mélo**

**TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO MODULA A  
ORGANIZAÇÃO TECIDUAL E MANUTENÇÃO DAS  
PROPRIEDADES MECÂNICAS EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE LESÃO CUTÂNEA.**

**São Paulo, SP**

**2021**



**Dominique Cavalcanti Mélo**



**TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO MODULA A  
ORGANIZAÇÃO TECIDUAL E MANUTENÇÃO DAS  
PROPRIEDADES MECÂNICAS EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE LESÃO CUTÂNEA.**

**Tese apresentada ao programa de  
Mestrado e Doutorado da  
Universidade Nove de Julho, como  
requisito para a obtenção do Título  
de Doutora em Biofotônica  
Aplicada às Ciências da Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos**

**São Paulo, SP  
2021**

Méllo, Dominique Cavalcanti.

Terapia por fotobiomodulação modula a organização tecidual e manutenção das propriedades mecânicas em modelo experimental de lesão cutânea. / Dominique Cavalcanti Méllo. 2021.

50 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Cicatriz. 2. Terapia a laser de baixa intensidade. 3. Colágeno. 4. Propriedades mecânicas. 5. Diclofenaco.

I. Marcos, Rodrigo Labat. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 16 de dezembro de 2021.

### TERMO DE APROVAÇÃO

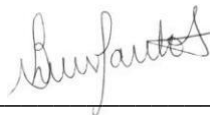
Aluno (a): Dominique Cavalcanti Mello

Título da Tese: “Terapia por fotobiomodulação auxilia a organização tecidual e manutenção das propriedades mecânicas da pele, em modelo experimental de lesão cutânea”.

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro: PROF. DR. LÚCIO FRIGO



Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF. DR. JOSÉ CARLOS COGO



**Dedico este trabalho:**

**Ao meu marido, Emmanuel**

**Ao meu filho, Guilherme**

**Aos meus pais, Vivaldo e Mary**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais Vivaldo da Cruz Mélo e Maria José Cavalcanti Mélo pelo permanente incentivo de sempre continuar evoluindo.**

**Ao meu marido Emmanuel Lopes dos Anjos pela paciência e pelo suporte nos momentos em que achei que não daria conta de terminar.**

**Ao meu filho Guilherme Emmanuel Mello dos Anjos por sua tranquilidade em todos os momentos e a inspiração em me tornar melhor desde o dia que soube da sua existência na minha vida.**

**Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, pela orientação, paciência, dedicação, apoio e amizade, sem você não conseguiria chegar até aqui.**

**A todos os colegas do grupo de pesquisa, principalmente ao Janio, Cristina Capeloa, Marília Del Bel, Patrícia Almeida Mattos, Solange Almeida Santos, Hueliton Wilian Kido, Rachel Bharbara Dalmaso Maccheronio Dalmaso e Luiz Gustavo Balaguer Cruz.**

**A todos os professores Doutores que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.**

**MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!**

**Estudar é luz, não estudar é treva.  
Quem continua estudando em qualquer  
idade mantém a beleza e a refrescante  
disposição em sua vida e consegue viver de  
forma mais profícua.**

**Daisaku Ikeda**

(365 dias  
Frases para mulheres)

## RESUMO

A pele é um tecido de revestimento que sofre permanente ação do ambiente, muitas vezes de forma agressiva, levando a lesão deste tecido. Geralmente em seu processo de reparo ocorrem alterações estruturais que evoluem para o desenvolvimento de uma cicatriz. A terapia por fotobiomodulação (FBM) é um recurso utilizado para modular o processo inflamatório auxiliando no processo de reparo da pele. Contudo, o efeito da FBM sobre as propriedades mecânicas da pele e o reflexo na qualidade tecidual, além da comparação com terapias farmacológicas ainda não foram avaliadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação na manutenção das propriedades mecânicas e na organização tecidual em modelo experimental de lesão cutânea. **Metodologia:** Ratos Wistar foram distribuídos em 5 grupos, a saber: Controle sem lesão (CTL), Lesão sem tratamento (NT), Lesão + anti-inflamatório (DIC), Lesão + laser 1J (PBM1J) e Lesão + laser 3J (PBM3J). Após anestesia, foi realizada incisão cutânea de 5 mm, utilizando bisturi cirúrgico. Após 7 e 30 dias foi realizada eutanásia e o tecido epitelial na região da lesão foi removida e encaminhada para análises histológicas e biomecânicas. **Resultados:** O grupo NT apresentou redução das propriedades mecânicas (Fmax e Dmax) e tecido epitelial desorganizado após 30 dias da indução da lesão, quando comparado ao grupo CTL. Todos os grupos tratados apresentaram melhora na organização tecidual quando comparado ao grupo NT. O grupo PBM1J apresentou significativa melhora das propriedades mecânicas e na organização histológica. Concluímos que a utilização do diclofenaco de sódio não alterou as propriedades mecânicas da pele quando comparado ao grupo NT. A terapia por fotobiomodulação apresentou expressiva melhora das propriedades mecânicas (Fmax e Dmax) além da melhora na organização tecidual, semelhante ao grupo controle.

Palavras-chave: Cicatriz; terapia a laser de baixa intensidade; colágeno; propriedades mecânicas; diclofenaco



## ABSTRACT

The skin is a covering tissue that undergoes permanent environmental action, often aggressively, leading to injury to this tissue. Generally, in its repair process, structural changes occur that evolve to the development of a scar. Photobiomodulation therapy (FBM) is a resource used to modulate the inflammatory process, helping the skin repair process. However, the effect of FBM on the mechanical properties of the skin and the reflex on tissue quality, in addition to the comparison with pharmacological therapies, has not yet been evaluated. The objective of this work was to evaluate the effect of photobiomodulation therapy on the maintenance of mechanical properties and tissue organization in an experimental model of skin injury. Methodology: Wistar rats were divided into 5 groups, namely: Control without lesion (CTL), Lesion without treatment (NT), Lesion + anti-inflammatory (DIC), Lesion + 1J laser (PBM1J) and Lesion + 3J laser (PBM3J). After anesthesia, a 5 mm skin incision was made using a surgical scalpel. After 7 and 30 days, euthanasia was performed and the epithelial tissue in the region of the lesion was removed and sent for histological and biomechanical analysis. Results: The NT group showed reduced mechanical properties (Fmax and Dmax) and disorganized epithelial tissue after 30 days of lesion induction, when compared to the CTL group. All treated groups showed improvement in tissue organization when compared to the NT group. The PBM1J group showed significant improvement in mechanical properties and histological organization. We concluded that the use of diclofenac sodium did not change the mechanical properties of the skin when compared to the NT group. Photobiomodulation therapy showed significant improvement in mechanical properties (Fmax and Dmax) in addition to improvement in tissue organization, similar to the control group.

Keywords: Scar; low level laser therapy; collagen; mechanical properties; diclofenac.

## Lista de Abreviaturas

$K_s$  - Rigidez secante

ANOVA - análise de variância

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado

CTL - Controle

DE - Densidade de energia

DIC - Cicatriz + anti-inflamatório

$D_{max}$  - Descolamento no momento da ruptura máxima

DP - Densidade de potência

FBM - fotobiomodulação

FBM1J – cicatriz + laser 1J

FBM3J - cicatriz + laser 3J

FDA - Food and Drug Administration (Estados Unidos da América)

$F_{max}$  - Força de ruptura máxima

I.M. – intramuscular

IL1- $\beta$ - Interleucina-1 beta

J – Joule

J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetro quadrado

Kg – quilograma

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

mm – Milímetros

MMP – Metaloproteinase da Matriz

mW – Mili Watt

nm – Nanometro

NT - Cicatriz sem tratamento

°C – graus Célsius

PGE2 - prostaglandine E2

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral

$\lambda$  - Comprimento de onda

## LISTA DE FIGURAS / GRAFICOS / QUADROS

<b>Figura 1:</b> Esboço do animal com incisão e retalho	<b>23</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema dos grupos experimentais	<b>24</b>
<b>Figura 3:</b> Quadro com os parâmetros de irradiação laser	<b>25</b>
<b>Figura 4:</b> Linha do Tempo do Protocolo Experimental	<b>25</b>
<b>Figura 5:</b> Gráfico do ensaio de tração	<b>26</b>
<b>Figura 6:</b> Aparelho Intermetric ensaio de tração	<b>27</b>
<b>Figura 7:</b> Gráfico de Força Máxima (Fmax), Deformação máxima (Dmax) e Relação entre Fmax e Dmax no momento da ruptura total da pele.	<b>30</b>
<b>Figura 8:</b> Imagem histológica do Grupo controle (CTL) com coloração Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x 7 dias (A) e 28 dias (B)	<b>31</b>
<b>Figura 9:</b> Imagem histológica do Grupo não tratado (NT) com coloração Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x 7 dias (A) e 28 dias (B)	<b>32</b>
<b>Figura 10:</b> Imagem histológica do Grupo diclofenaco (DIC) com coloração Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x 7 dias (A) e 28 dias (B)	<b>33</b>
<b>Figura 11:</b> Imagem histológica do Grupo laser 3J (L3) com coloração Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x 7 dias (A) e 28 dias (B)	<b>34</b>
<b>Figura 12:</b> : Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Grupo CTL e NT	<b>35</b>
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Grupo NT e DIC	<b>36</b>
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Grupo NT e PBM1J	<b>37</b>
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Grupo NT e PBM3J	<b>38</b>
<b>Figura 16:</b> Gráfico da proporção de colágeno a partir da análise das imagens polarizadas de pele coradas com <i>Picrosirius</i>	<b>39</b>
<b>Figura 17:</b> Gráfico da relação de colágeno tipo I e tipo III. Grupos Experimentais	<b>40</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Pele	14
1.2 Processo de reparo da pele	16
1.3 Colágeno e propriedades mecânicas no reparo da pele	17
1.4 Tratamentos utilizados na cicatrização (Tratamento farmacológico e outros)	18
1.5 Terapia por fotobiomodulação	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1 Animais	23
3.2 Indução da Cicatriz	23
3.3 Grupos Experimentais	24
3.4 Aplicação da terapia farmacológica (DIC)	25
3.5 Aplicação da terapia por fotobiomodulação (FBM)	25
3.6 Propriedades mecânicas da pele	26
3.7 Preparação histológica das amostras	27
3.8 Quantificação do Colágenos tipo I e tipo III	28
3.9 Análise estatística	28
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>29</b>
4.1 Propriedades Biomecânicas – Determinação de Fmax e Dmax	29
4.2 Análises histológicas com Hematoxilina Eosina (HE) – Identificação de vasos e outros componentes celulares	31
4.3 Análises histológicas com <i>Picrosirius</i> – Avaliação da proporção de colágeno tipo I e III por luz polarizada	35
4.4 Quantificação da proporção de colágeno tipo I e III por luz polarizada	39

<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>46</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando mais de 15% do peso corpóreo do indivíduo e devido sua grande extensão. Suas características topográficas e pelo fato de ser um órgão de revestimento está sujeito a agressões durante todas as fases de vida do ser humano. Dessa forma, é objeto de preocupação no intuito de protegê-la, evitando complicações relacionadas às sequelas que podem comprometer a atividade do indivíduo levando ao afastamento do trabalho ou a aposentadoria precoce por invalidez (1-4).

Apesar dos grandes avanços na compreensão das diversas fases do reparo tecidual, o gasto com tratamento de feridas é relevante. Somente nos EUA o gasto em tratamento de feridas chega a aproximadamente U\$50 bilhões. O reparo tecidual vai ocorrer independente do tratamento, entretanto a qualidade desta cicatriz e as propriedades mecânicas desta pele após o reparo irão interferir na qualidade de vida dessas pessoas portadoras de lesão além de possibilitar a reincidência de lesão (5).

O tratamento de lesão pode ser iniciado farmacologicamente com anti-inflamatórios sistêmicos ou tópicos. Atualmente além destes tratamentos utilizam-se coberturas que promovem um meio adequado para a cicatrização e ultimamente tem-se utilizado a terapia por fotobiomodulação no auxílio deste processo. Entretanto, não se sabe muito sobre os efeitos da fotobiomodulação nas propriedades mecânicas e na proporção de colágeno da pele, dessa forma esse estudo visa entender esse processo (5, 6).

### 1.1 Pele

A pele é um órgão complexo, formado por um epitélio de superfície chamado de epiderme, seguido por uma camada de tecido conjuntivo subjacente chamada derme e por uma terceira camada intimamente ligada à fáscia profunda conhecida como hipoderme e embora os limites entre as porções de tecido epitelial e conjuntivo da pele sejam bem descritos, alguns elementos fibrosos da derme misturam-se com os da hipoderme, não havendo uma delimitação nítida entre tais camadas (7).

A epiderme é a camada mais superficial sendo constituída por epitélio estratificado cuja espessura pode variar de 0,04mm (pálpebras) até 1,6mm (palmas e plantas). A epiderme é subdividida em estrato córneo composto de células mortas preenchidas com queratina; estrato lúcido; estrato granuloso composto de grânulos lamelares; estrato espinhoso composto por queratinócitos e estrato basal onde temos os melanócitos e células de Merkel (8-11).

A derme é a segunda camada, mais profunda e é subdividida em derme papilar composta de tecido conjuntivo frouxo, onde encontramos muitas células como macrófagos, fibroblastos e plasmócitos e temos também a presença de receptores e alças capilares nas papilas (termorreguladores); e a derme reticular por tecido conjuntivo denso não modelado de característica fibroelástica (colágeno tipo I, grossas fibras elásticas e proteoglicanas) onde encontraremos outras estruturas como redes vasculares, redes nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e folículos pilosos; e possui menor número de células quando comparado a derme papilar (8-11).

A terceira camada e mais profunda das três é a hipoderme e é composta de tecido adiposo que atua como reserva energética, isolante térmico e amortecimento (8-11).

Esta divisão celular da pele em camadas é didática e devido a sua ampla extensão e ao fato de ser o revestimento de áreas bem peculiares do corpo humano, podem-se encontrar variações estruturais, citológicas e histológicas quando é avaliado amostras de pele de diferentes áreas do corpo humano (12).

A pele desempenha várias funções de vital importância, constituindo uma barreira de proteção para as estruturas internas do organismo às agressões de agentes externos de qualquer natureza. Função termorregulação através da sua rede vascular, glândulas sudoríparas e tecido adiposo. Função de excreção onde as glândulas sudoríparas eliminam vários produtos tóxicos como ureia, amônia e ácido úrico. Função sensorial através das células de Merkel e terminações nervosas sensitivas presentes na derme. E por fim função metabólica onde a secreção do pré hormônio vitamina D após a exposição aos raios solares e o tecido adiposo constitui uma reserva energética (8, 13).

## 1.2 Processo de Reparo da Pele

O reparo tecidual é um processo fisiológico multifacetado que se inicia a partir de uma resposta inflamatória, sendo um processo sistêmico e dinâmico, relacionado diretamente as condições gerais do organismo. Este processo pode ser dividido, em fases sequenciais, porém sobrepostas; hemostasia, migração (inflamatória), proliferação e remodelação (8, 10, 14, 15).

Durante a hemostasia, ocorre o controle do sangramento onde as plaquetas formarão coágulos para conter o sangramento além de liberarem fatores quimiotáxicos na corrente sanguínea. Na fase inflamatória ocorre o aumento da permeabilidade vascular, permitindo a passagem de plasma, eritrócitos e leucócitos para o local da lesão. A intensidade da fase inflamatória está relacionada ao tipo e grau de lesão tecidual. Esta fase dura em torno de 4 a 8 dias (8, 10, 16).

Na fase proliferativa ocorrerá à multiplicação no número de células das linhagens celulares que estão na região e de fibroblastos, junto com a produção de elementos estruturais que preencherão a lesão, favorecendo o reparo tecidual e do epitélio, formando um tecido de granulação com aspecto granuloso e avermelhado (14, 17).

A atividade mitótica do fibroblasto é reduzida após 2 semanas da lesão e as células começam a secretar colágeno além de outras substâncias fundamentais. Nesta fase inicia-se a formação do epitélio auxiliada pela divisão e migração de células da camada basal da epiderme para a área de reparo do tecido conjuntivo subjacente (18).

Na remodelação, as células fagocitárias irão absorver os componentes da matriz extracelular em excesso, determinadas colagenases e proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas darão a direção correta às fibras colágenas difusas, produzindo assim uma cicatriz. Nesta fase ocorrerá a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a cicatriz tornará menos espessa, passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (8, 14).

Durante a cicatrização, diferentemente do reparo tecidual, pode haver a regeneração onde o tecido não se restabelece, formando um tecido cicatricial espesso e denso o que comumente chamamos de cicatriz hipertrófica. Dessa forma, no processo de reparo tecidual, a regeneração e a cicatrização devem ser consideradas como eventos distintos, agindo em conjunto a fim de manter a



estrutura anatômica e a função da região afetada. Este fenômeno envolve vários fatores e o desequilíbrio ou a ausência de compostos (mediadores inflamatórios, elementos figurados do sangue, matriz extracelular e células parenquimatosas), principalmente os envolvidos na formação do colágeno compromete o resultado da cicatrização (9, 14).

### **1.3. Colágeno e Propriedades Mecânicas da Pele (Tipo I e III no reparo 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 fibroblastos, elastina, colágeno, 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 (19, 20).

As alterações das propriedades mecânicas da pele após um processo lesivo estão diretamente relacionadas com a proporção e qualidade do colágeno (21, 22). O colágeno sintetizado pelas células tem uma importância fundamental na constituição da matriz extracelular no tecido conjuntivo, sendo responsável por suas propriedades mecânicas. O colágeno pode formar fibras com organizações específicas dependendo do tecido biológico e esta organização pode sofrer perturbações importantes após o processo lesivo (23). Após a lesão o colágeno tipo IV, que formam redes flexíveis nas membranas basais, serão substituídos por colágenos fibrilares (colágeno tipo I e III) que darão resistência à tração e rigidez (24).

Estas alterações quantitativas e qualitativas do colágeno interferem diretamente nas propriedades mecânicas do tecido biológico. 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 (25, 26).

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

(27, 28). No entanto o colágeno pode sofrer ação de enzimas específicas que promovem sua biodegradação, as metaloproteases (MMPs), reduzindo de forma significativa suas propriedades mecânicas (6). Porém, apesar de ser conhecida a importância do colágeno nas propriedades mecânicas do tecido, alguns fatores como sua proporção, distribuição e organização ainda não foram totalmente esclarecidas.

#### **1.4 Tratamentos utilizados na cicatrização (Tratamento farmacológico e outros)**

Apesar dos grandes avanços na compreensão das diversas fases do reparo tecidual, a incidência e prevalência de úlceras crônicas são extremamente altas. Neste sentido, vários fatores podem influenciar na alteração do reparo tecidual, entre elas o processo de envelhecimento, doenças cardiovasculares, diabetes, radiação UV-B, tabagismo e alcoolismo (29-31). Estes fatores têm mobilizado a indústria farmacêutica e de cosméticos a desenvolverem produtos específicos adequados para cada tipo de lesão na pele.

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é uma técnica a partir de métodos físicos, bastante utilizada e difundida em vários países e consiste na utilização do oxigênio que submetido a uma alta pressão pode aumentar sua difusão no sangue, estimulando tanto elementos celulares quanto o próprio plasma, conseguindo desta maneira hiper oxigenar as áreas lesadas (32, 33).

Outra terapia que utiliza curativos à vácuo para criar uma pressão negativa, conhecida como terapia de pressão sub-atmosférica, mesmo sendo utilizada desde a década de 90, ainda está em fase de implementação em várias regiões do mundo. Trata-se de um curativo (esponja, gaze, espuma) acondicionado a um sistema fechado sob o leito da lesão ligado através de uma mangueira a uma bomba que gera pressão negativa (ou vácuo). Promove-se desta maneira a sucção dos líquidos produzidos na ferida além de tracionar centripetamente as bordas da lesão levando a diminuição de seu tamanho além de promover a chegada de células, oxigênio e outros importantes fatores endógenos para o leito da ferida, promovendo desta forma o reparo tecidual (34, 35).

Atualmente após um procedimento cirúrgico utiliza-se para auxílio no reparo da lesão e para redução da dor, tratamentos farmacológicos como uso de medicamentos anti-inflamatórios tanto locais como sistemicamente. O diclofenaco de sódio é um desses medicamentos que são utilizados para controle da dor e redução da reação inflamatória que pode ocorrer após um procedimento cirúrgico.

Entretanto o uso desses medicamentos tem sido discutido por sua possível interferência no processo de reparo tecidual. Duman realizou um experimento em modelo pré-clínico onde avaliou os efeitos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e os corticoides utilizados em pós-operatórios, basicamente para fins analgésicos. Ele concluiu que esses medicamentos podem ter efeitos negativos no processo de cicatrização provavelmente por suprimir a inflamação e a proliferação de fibroblastos (36).

O mercado do tratamento de lesões conta também com uma variedade enorme de coberturas na tentativa de fechar as feridas, dentre elas podemos citar os alginatos de cálcio e sódio; as hidrofibras com e sem prata, as espumas de poliuretano associadas à prata ou ao ibuprofeno, as membranas de celulose com ou sem aditivos, coberturas em gel entre outras coberturas. E o uso adequado dessas coberturas permite que se realize uma cicatrização.

Em geral, as terapias utilizadas atualmente visam tanto a remoção do tecido lesionado quanto o estímulo de um novo tecido que atenda as exigências anatômicas e funcionais da pele. No entanto, não sabemos ao certo se esse novo tecido apresenta propriedades mecânicas próximas ao tecido original, justificando a necessidade do estudo de novas terapias que possam promover este rearranjo do tecido epitelial.

### **1.5 Terapia por Fotobiomodulação**

A terapia por fotobiomodulação é conhecida por sua importante ação na fase inflamatória, ativando queratinócitos e sintetizando colágeno promovendo não só a modulação do processo inflamatório, mas também o reparo tecidual, contribuindo para a melhora na qualidade histológica do tecido (37). Os primeiros estudos publicados por Mester(38), Van Breugel (39) e PoGrel (40) utilizando a fotobiomodulação no reparo tecidual permitiram que esta terapia fosse aprovada

pelo Food and Drug Administration norte-americano (FDA) como um importante método de promoção do processo de cicatrização (41).

Considera-se que este reparo tecidual se deve a modificações histológicas através da redução do infiltrado inflamatório, do aumento do tecido de granulação, da epitelização, do aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de matriz extracelular rica em colágeno além de neovascularização, o que contribuiria para uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial (18, 41, 42).

Trabalhos recentes mostraram um potencial efeito reparador do laser, no aumento da expressão de colágeno tipo I e na reorganização destas fibras (43-45).

Em relação ao seu possível mecanismo de ação no processo de cicatrização da pele, existem evidências que o laser pode reduzir a expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios como PGE2, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e aumentar a expressão de outros mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (46-48).

O laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas collagenases (MMPs) e conseqüentemente controlar a degradação de colágeno, favorecendo o rearranjo das fibras de colágeno, levando a uma melhora nas condições biomecânicas em tecidos pouco vascularizados durante o processo de reparo (26, 49-51).

Em relação ao comprimento de onda, os primeiros estudos demonstraram que o laser vermelho apresentaria maior eficácia no reparo de feridas quando comparado ao infravermelho (52, 53). Ao contrário, Reddy e colaboradores (54) publicaram um trabalho mostrando que o laser infravermelho promove um aumento na resistência à tração em pele em modelo experimental (52-54).

Inúmeros estudos clínicos ou pré-clínicos foram realizados, fazendo com que a fotobiomodulação seja considerada uma alternativa terapêutica no processo de cicatrização (30, 44, 47, 55-60).

Contudo, a literatura a respeito da terapia com fotobiomodulação na aceleração da cicatrização de feridas é muito controversa, uma vez que uma parte dos estudos mostram resultados positivos enquanto outra parte mostra pouco ou nenhum efeito neste processo de reparo. Estas disparidades podem estar relacionadas aos diferentes protocolos utilizados pelos autores (61).

Atualmente, acredita-se que o laser possui uma ação moduladora no processo inflamatório podendo tanto bioestimular quanto bioinibir a cicatrização através da determinação de diversos parâmetros de irradiação tais como comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, número de aplicações do laser, tempo de tratamento e o tecido a ser tratado. Porém, ainda não existe um consenso em relação à dosimetria exata a ser administrada para cada tipo de tratamento ou para cada patologia ou processo a ser abordado (62, 63).

Tendo em vista os fatos apresentados anteriormente, torna-se importante a realização de estudos demonstrando o efeito reparador da terapia por fotobiomodulação e seu reflexo na manutenção das propriedades mecânicas e na organização tecidual, finalizando na qualidade da pele cicatrizada.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral:

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação na manutenção das propriedades mecânicas e na organização tecidual em modelo experimental de lesão cutânea.

### 2.2 Específico:

- Avaliar as alterações histológicas na região da lesão cutânea, após a indução da lesão;

- Mensurar a Força máxima e a Deformação máxima, no momento da ruptura, na pele após indução da lesão, durante ensaio mecânico cíclico de tração;

- Comparar a organização tecidual a partir das imagens histológicas e as propriedades mecânicas da pele, após a lesão cutânea e no tratamento farmacológico com Diclofenaco de Sódio ou na terapia por Fotobiomodulação.

- Quantificar a proporção de colágeno tipo I e III nas imagens histológicas coloradas com *Picrosirius* em luz polarizada, nos diferentes tratamentos (farmacológico e fotobiomodulação).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 25 ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho sob o número (3295160919).

#### 3.2 Indução da cicatriz

Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e xilasina (90mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, injeção intraperitoneal). Após a anestesia, foram realizadas 2 incisões cirúrgicas longitudinais de 5 mm na região central do dorso no animal, utilizando um bisturi cirúrgico nº 15; a lesão foi aproximada com fita microporosa durante 24h.

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

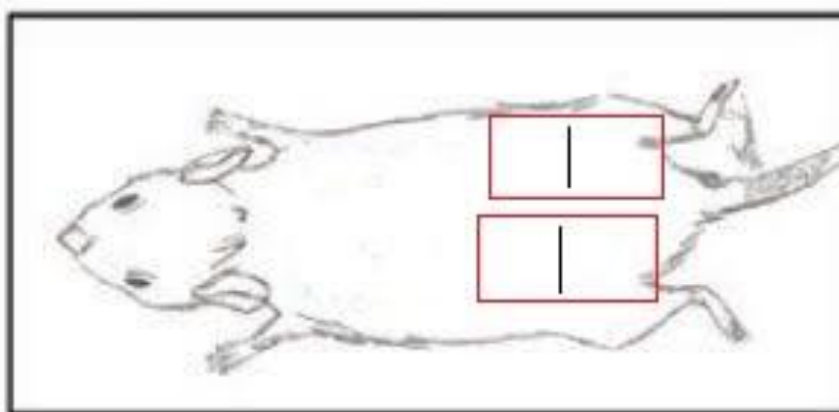


Figura 1: Esboço do animal com incisão e retalho

### 3.3 Grupos Experimentais

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

- Grupo Controle (CTL): Animais com pele íntegra.
- Grupo com lesão e não tratado (NT): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e sem tratamento, sacrificados após 28 dias a partir da indução da corte.
- Grupo com lesão tratado com Diclofenaco de sódio (DIC): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com aplicações diárias de Diclofenaco de Sódio Gel 10mg/g tópico. O primeiro tratamento foi realizado imediatamente após a indução do corte na pele do animal e mantido até o sétimo dia do início da lesão.
- Grupo lesão tratado com fotobiomodulação 1J (PBM1J): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com laserterapia no comprimento de onda de 830nm, 1J de energia e 100mW de potência.
- Grupo lesão tratado com fotobiomodulação 3J (PBM3J): Animais com incisão cirúrgica por bisturi e tratados com laserterapia no comprimento de onda de 830nm, 3J de energia e 100mW de potência.

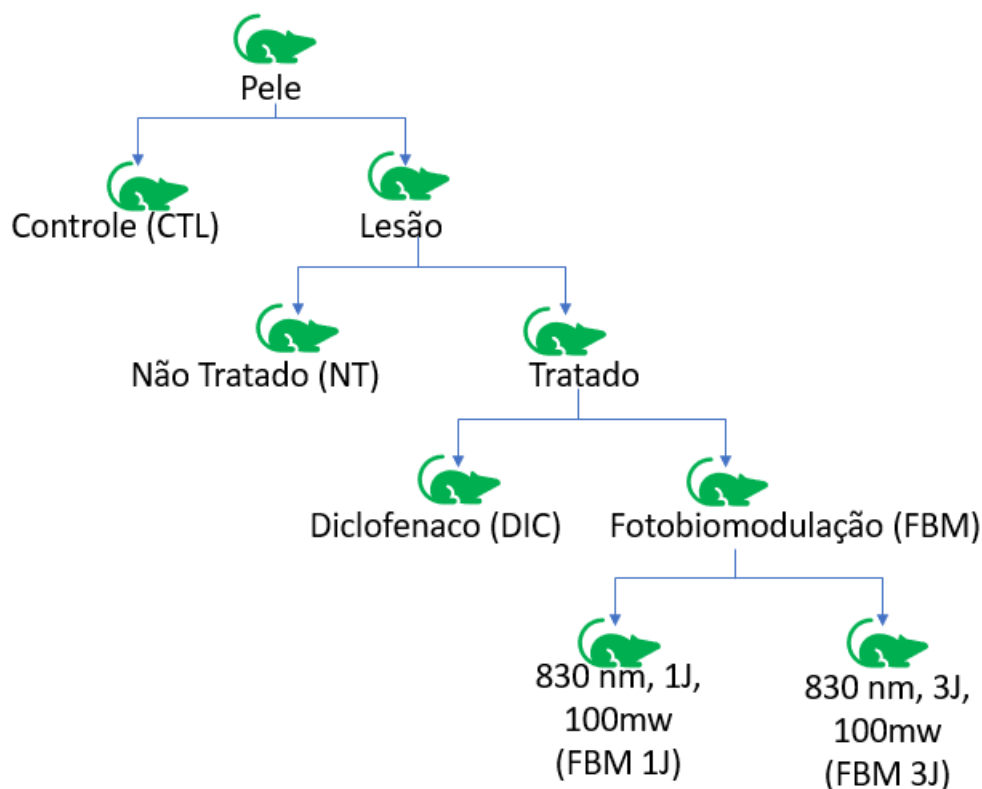


Figura 2. Esquema dos grupos experimentais



### 3.4 Aplicação de Diclofenaco de sódio (DIC)

Após o procedimento de indução de lesão pelo corte com bisturi metálico, os animais do grupo DIC recebeu uma fina camada de Diclofenaco de Sódio Gel 10mg/g tópico, imediatamente após o processo lesivo e durante 7 dias seguidos, sendo aplicado 1 vez ao dia.

### 3.5 Aplicação da Terapia por Fotobiomodulação (FBM)

Após serem submetidos ao modelo de indução da lesão pelo corte com bisturi metálico, os animais dos grupos irradiados receberam o tratamento com laser de baixa potência 830nm com 3J e 1J de energia e 100mW de potência, diâmetro do feixe de 0,028cm<sup>2</sup> (Thera Lase, DMC®), imediatamente após o processo lesivo (figura 3). As irradiações foram pontuais (único ponto), por contato durante 7 dias.

Grupo	Comprimento de onda (nm)	Diodo	P (mW)	Diâmetro do feixe (cm <sup>2</sup> )	Irradiância (W/cm <sup>2</sup> )	E (J)	Fluência (J/cm <sup>2</sup> )	Tempo por ponto(s)
L1J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	1	35,7	10
L3J			100			3	107.14	30

Figura 3: Quadro com os parâmetros de irradiação laser.

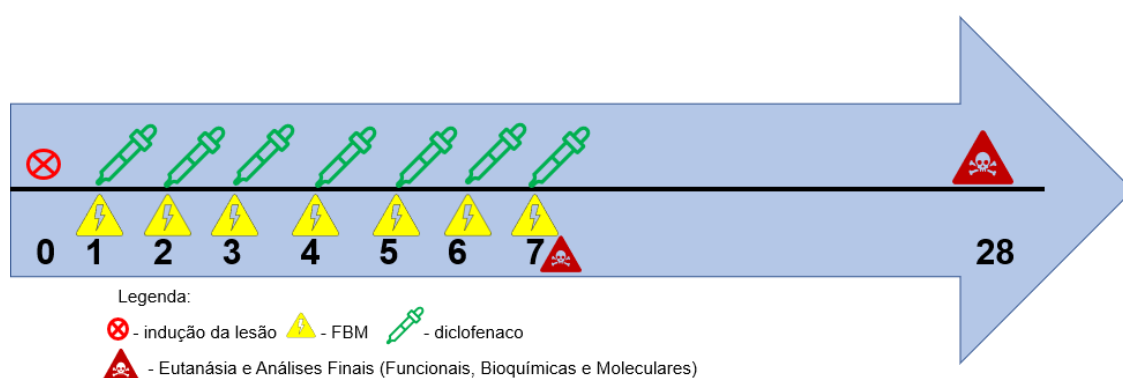


Figura 4 – Linha do Tempo do Protocolo Experimental

### 3.6 Propriedades mecânicas da pele

Os animais de todos os grupos foram sacrificados após 28 dias do início do tratamento e retalhos da pele na região dorsal onde foi induzida a incisão, cirúrgica, com dimensões de 5mm de largura e 15mm de comprimento, foram removidos para posteriores análises. Parte deste material foi utilizado imediatamente após a retirada, nos ensaios de tração para a avaliação de suas propriedades mecânicas. A atividade normal da pele é formada por um conjunto de tensões aplicadas no tecido, divididas em forças de carregamento e descarregamento. Desta forma, foi aplicada uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais da pele (figura 5A).

Primeiramente foram realizadas as medidas de comprimento, largura e altura do retalho. Estes valores foram utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. Cada extremidade da pele foi fixado em grampos para cada extremidade do retalho de pele, no aparelho de ensaio mecânico (Intermetric). Vários testes de carregamento e descarregamento de forças foram realizados até o momento da ruptura do tecido, conforme indicado na figura 5 abaixo.

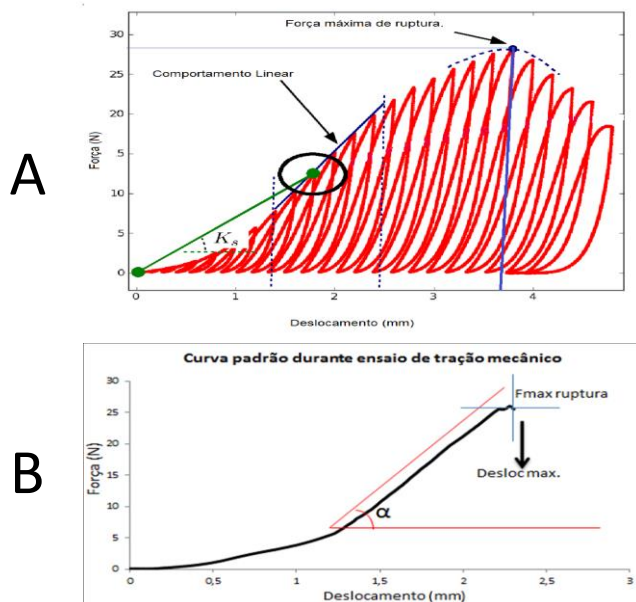


Figura 5: Gráfico do ensaio de tração. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.

Durante a padronização do ensaio de tração, foi utilizada uma velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0,5mm durante cada carregamento. O teste de tração mecânico foi interrompido

automaticamente (figura 5B), após a ruptura do tecido e foram analisados os seguintes parâmetros: Força de ruptura máxima ( $F_{max}$ ), Descolamento no momento da ruptura máxima ( $D_{max}$ ) (26).



Figura 6: Aparelho Intermetric realização de ensaio de tração

### 3.7 Preparação histológica das amostras

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

Foi observada a organização do tecido no local da lesão presença de vasos, presença de hemorragia e infiltrado inflamatório, quantificação de colágeno tipo I e tipo III.

### **3.8 Quantificação dos Colágenos tipo I e tipo III**

Realizou-se a análise das imagens através do software Image Pro Plus 10. Esse programa identifica o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho, amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto o verde é igual a colágeno tipo III (imaturo). Os resultados foram expressos em área percentual e quantificados em pixels e a análise quantitativa foi realizada a partir de rotinas criadas para padronização da avaliação do grupo de cores nas imagens dos cortes histológicos transversais corados com *Picrosirius* e fotografadas em aumento de 400X. O colágeno tipo I e III foi contabilizado e o percentual utilizado para confecção dos gráficos.

### **3.9 Análise Estatística**

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software Incorporation, San Diego, EUA.

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

Os resultados qualitativos foram realizados a partir da imagem fotográfica das lâminas histológicas e com descrição das informações identificadas.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Propriedades Biomecânicas – Determinação de Fmax e Dmax

Após o ensaio cíclico de tração da pele, foi obtida a Força Máxima (Fmax) e a Deformação Máxima (Dmax), ambas no momento da ruptura da pele. No gráfico 7(A) foi observado a redução de Fmax no grupo NT quando comparado ao grupo CTL. Ambos os grupos tratados com DIC, como o grupo FBM1J aumentaram a Fmax quando comparado ao grupo NT. O grupo FBM1J apresentou aumento da Fmax quando comparado ao tratamento farmacológico (DIC). O grupo FBM3J não apresentou diferença quando comparado ao grupo NT.

No gráfico 7(B) foi observado a Deformação Máxima no momento da ruptura mecânica. Observou-se redução da Dmax no grupo NT quando comparado ao grupo CTL. Os grupos tratados com fármaco Diclofenaco de Sódio (DIC) e com terapia por fotobiomodulação com energia de 3 Joules (FBM3J) mantiveram valores de Dmax semelhantes do grupo NT. O grupo FBM1J aumentou os valores de Dmax quando comparado ao grupo NT, com capacidade de deformação semelhante ao grupo CTL.

No gráfico 7(C) é observada a relação entre a Força máxima e a Deformação máxima da pele, no momento da ruptura, após teste cíclico de tração. É possível observar que o grupo NT apresentou redução em ambas Fmax e Dmax, quando comparado ao grupo CTL. Os grupos DIC e FBM3J apresentaram Fmax e Dmax superiores ao grupo NT, mas ainda menores quando comparados ao grupo CTL. Já o grupo FBM1J apresentou Fmax e Dmax similares ao grupo CTL.

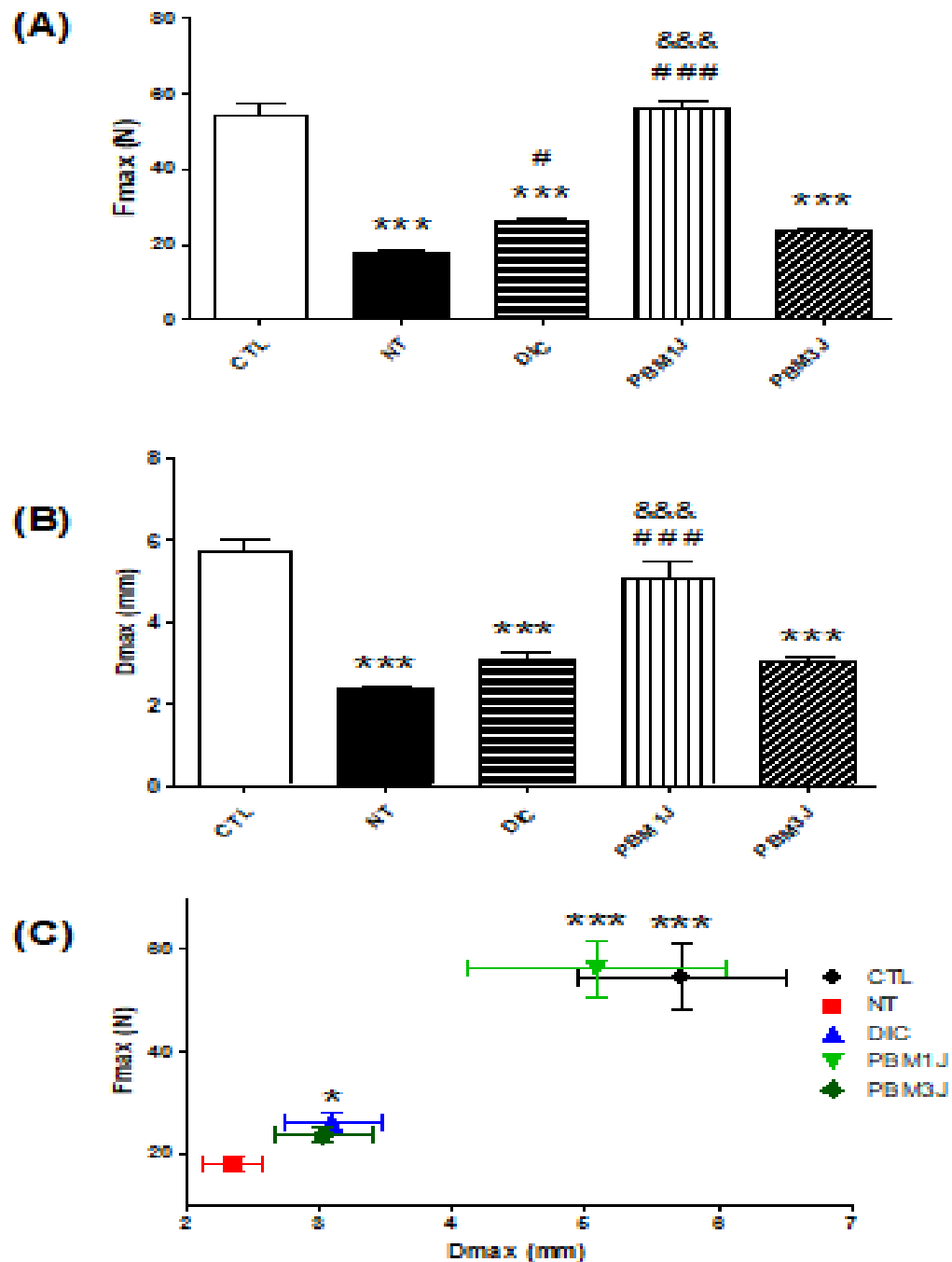
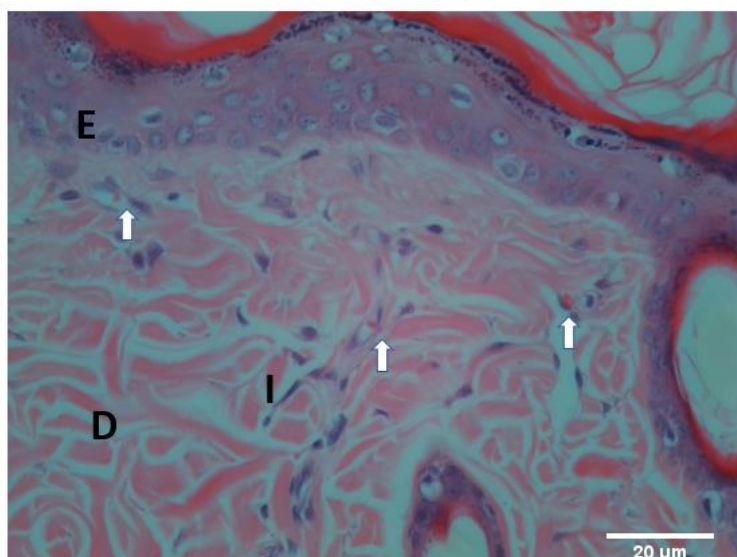


Figura 7: Gráfico de Força Máxima (Fmax), Deformação máxima (Dmax) e Relação entre Fmax e Dmax no momento da ruptura total da pele, no ensaio de tração cíclica. (A) Gráfico da Força máxima no momento da ruptura (Fmax); (B) Gráfico da Deformação máxima no momento da ruptura (Dmax). Grupos experimentais: Controle (CTL) e lesão sem tratamento (NT) ou tratado com Diclofenaco de Sódio tópico (DIC) ou Fotobiomodulação (PBM) com 1 ou 3 Joules. \*\*\* p<0,001 VS CTL; # p<0,05 e ### p<0,001 VS NT; &&& p<0,001 VS DIC. (C) Gráfico da relação entre Fmax e Dmax. \*p<0,05 e \*\*\* p<0,001 VS CTL.

#### 4.2 Análises histológicas com Hematoxilina eosina (HE) – identificação de vasos e outros componentes celulares

As lâminas a seguir (Fig. 8) nos mostram que após preparo das lâminas com Hematoxilina e eosina no grupo controle (CTL) 7 e 28 dias em que o tecido íntegro sem lesão foram identificados vasos, a epiderme e derme.

**CTL 7 dias (A)**



**CTL 28 dias (B)**

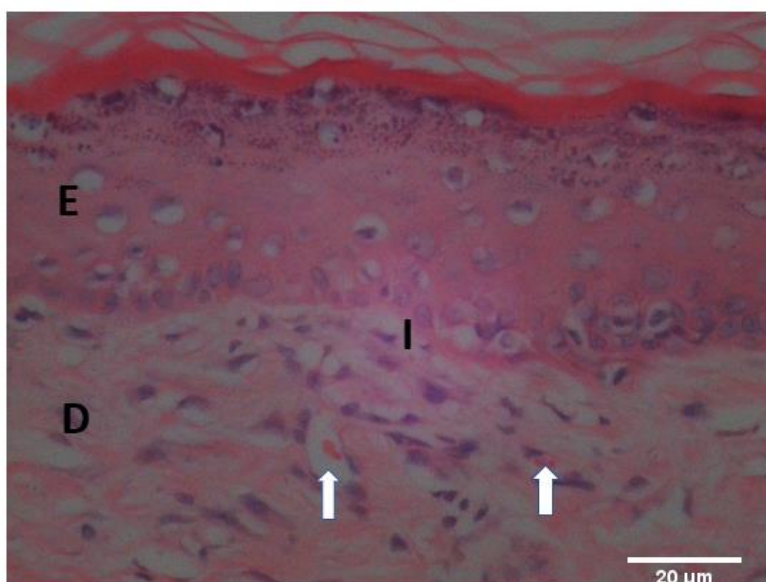
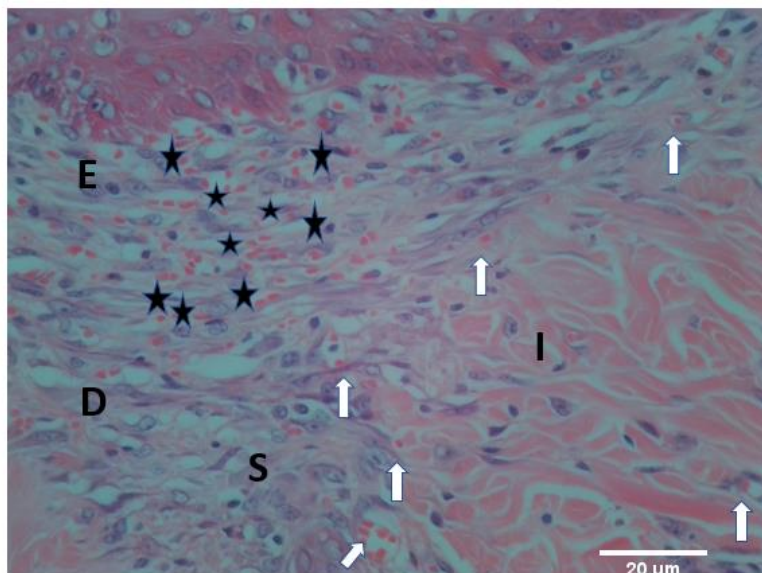


Figura 8: Imagem histológica do Grupo controle (CTL) 7 dias (A) e 28 dias (B). Visualizam-se vasos (setas brancas) e a organização do tecido sem lesão. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento 400x. Legenda: D – Derme; E- Epiderme; I – Tecido íntegro; seta branca - vasos

Na figura 9 o grupo não tratado (NT) com 7 e 28 dias em que temos o tecido com lesão foram identificados a derme e a epiderme, alguns vasos peri-lesão (setas brancas), tecido de granulação com aumento de infiltrado inflamatório (S) e hemorragia no tecido de granulação (estrelas).

#### NT 7 dias (A)



#### NT 28 dias (B)

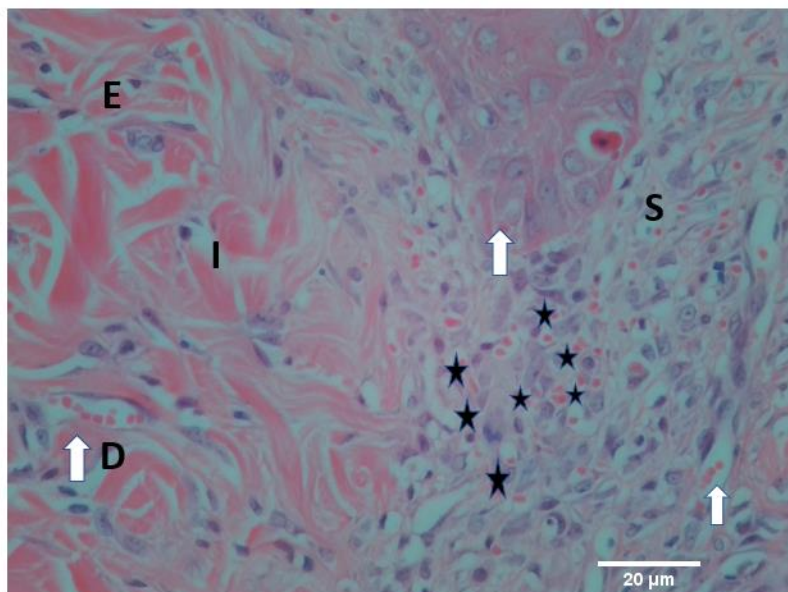
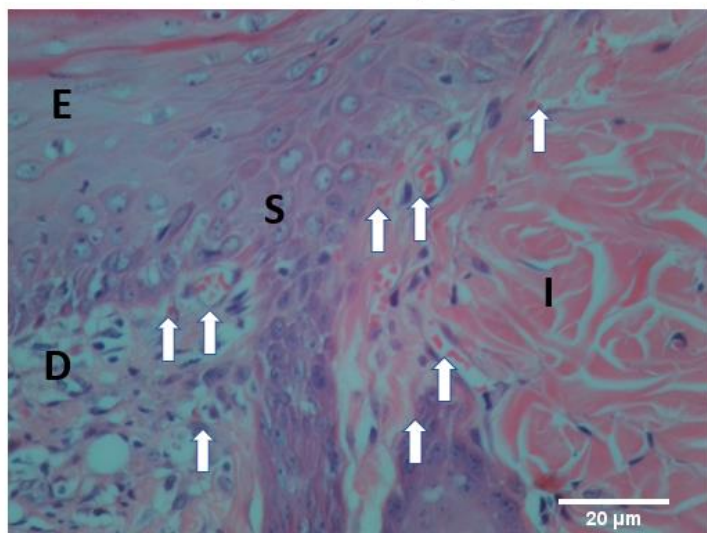


Figura 9: Imagem histológica do Grupo não tratado (NT) 7 dias (A) e 28 dias (B). Identifica-se o local do tecido de granulação (S), o tecido íntegro (I), área da lesão com hemorragia (estrelas) e vasos (setas brancas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento 400x. Legenda: D – Derme; E- Epiderme; I – Tecido íntegro; seta branca – vasos; Estrelas – Hemorragia; S – scar (cicatriz)



Na Figura 10 o grupo lesão tratado com diclofenaco de sódio (DIC) na lâmina com coloração de Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x 7 dias (A) e 28 dias (B). Identificam-se alguns vasos (seta brancas) na região do tecido de granulação (S) e não se consegue diferenciar entre tecido íntegro e a lesão na imagem (B); enquanto em (A) identifica-se o local de lesão e o tecido íntegro.

#### DIC 7 dias (A)



#### DIC 28 dias (B)

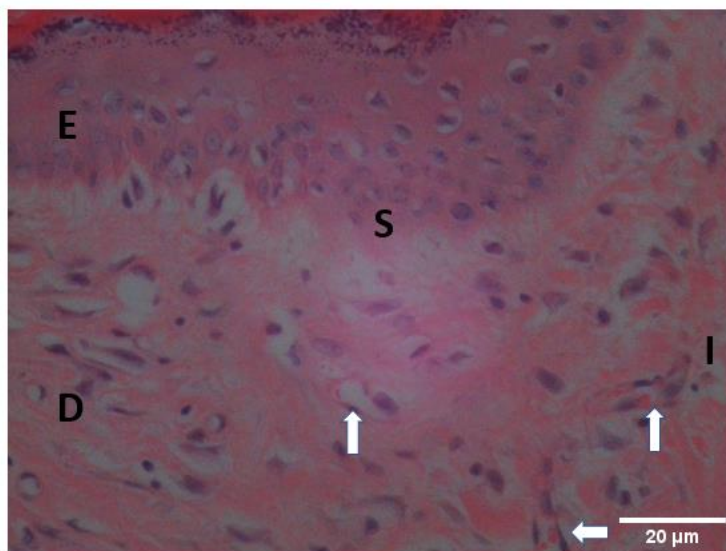
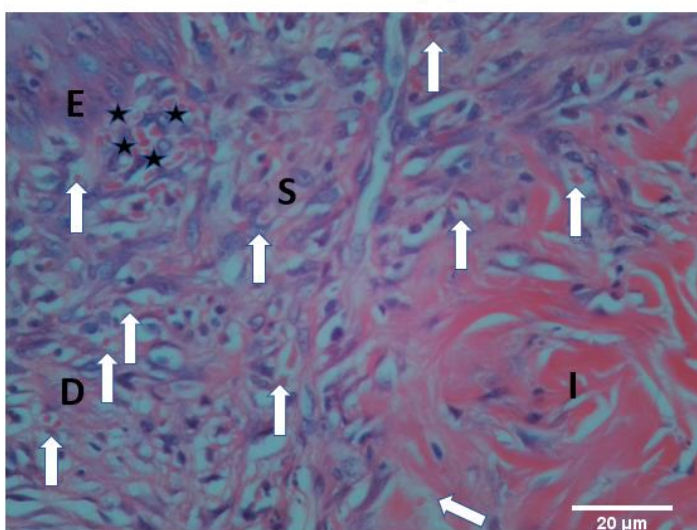


Figura 10: Imagem histológica do Grupo diclofenaco (DIC) 7 dias (A) e 28 dias (B). Identificam-se alguns vasos (seta brancas) na região de tecido de granulação (S) e não se consegue diferenciar entre tecido íntegro e a lesão na imagem (B) enquanto em (A) identifica-se o local de lesão e o tecido íntegro. Com coloração de Hematoxilina e Eosina com ampliação de 400x. Legenda: D – Derme; E- Epiderme; I – Tecido íntegro; seta branca – vasos; S – scar (cicatriz)

Na Figura 11 apresentamos a imagem histológica do Grupo Fotobiomodulação 3J (FBM3J) com a coloração de Hemoxilina e Eosina com ampliação de 400x no período de 7 dias (A) e 28 dias (B). Na Figura 9(A) identificamos vasos (setas brancas) no local do tecido de granulação (S), infiltrado inflamatório e pequena área de hemorragia (estrelas). Na Figura 9(B) visualizamos alguns vasos neoformados no local do tecido de granulação (S), mas fica difícil estabelecer onde está a lesão pois o tecido está muito uniforme, conseguimos identificar pois em imagens com menor ampliação mais profundamente o local da lesão.

**FBM3J 7 dias (A)**



**FBM3J 28 dias (B)**

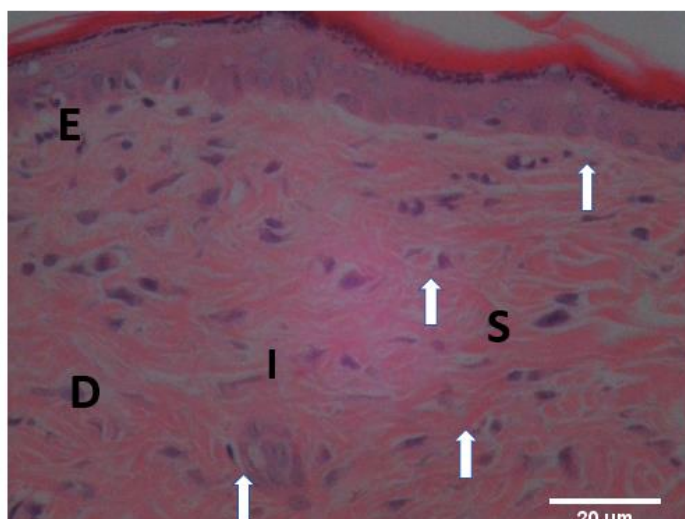


Figura 11: Imagem histológica do Grupo fotobiomodulação 3J (FBM3J) 7 dias em (A) e 28 dias (B). Identificam-se vasos (setas brancas) no local do tecido de granulação (S) e o tecido cicatrizado apresenta aparência semelhante ao tecido íntegro na imagem (B) enquanto na imagem (A) identifica-se o local da lesão e o tecido íntegro. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento 400x. Legenda: D – Derme; E- Epiderme; I – Tecido íntegro; seta branca – vasos; Estrelas – Hemorragia; S – scar (cicatriz)

### 4.3 Análises histológicas com *Picrosirius* - Avaliação da Proporção de Colágeno tipo I e III por Luz Polarizada.

As figuras 12, 13, 14 e 15 são imagens histológicas transversais representativas dos grupos experimentais, em luz polarizada da pele de ratos, coradas com *Picrosirius*, com tons de verde, referente a proporção de colágeno III e rosa, referente a proporção de colágeno I. As imagens. A figura 10A é uma imagem representativa do grupo Controle (CTL) onde é observado distribuição homogênea de cores em tons de rosa e verde. No grupo CTL é observado predomínio de tons de rosa. A figura 10B é apresentada uma imagem representativa do grupo lesão sem tratamento (NT), onde é observada tons escuros próximo a região da lesão (S).

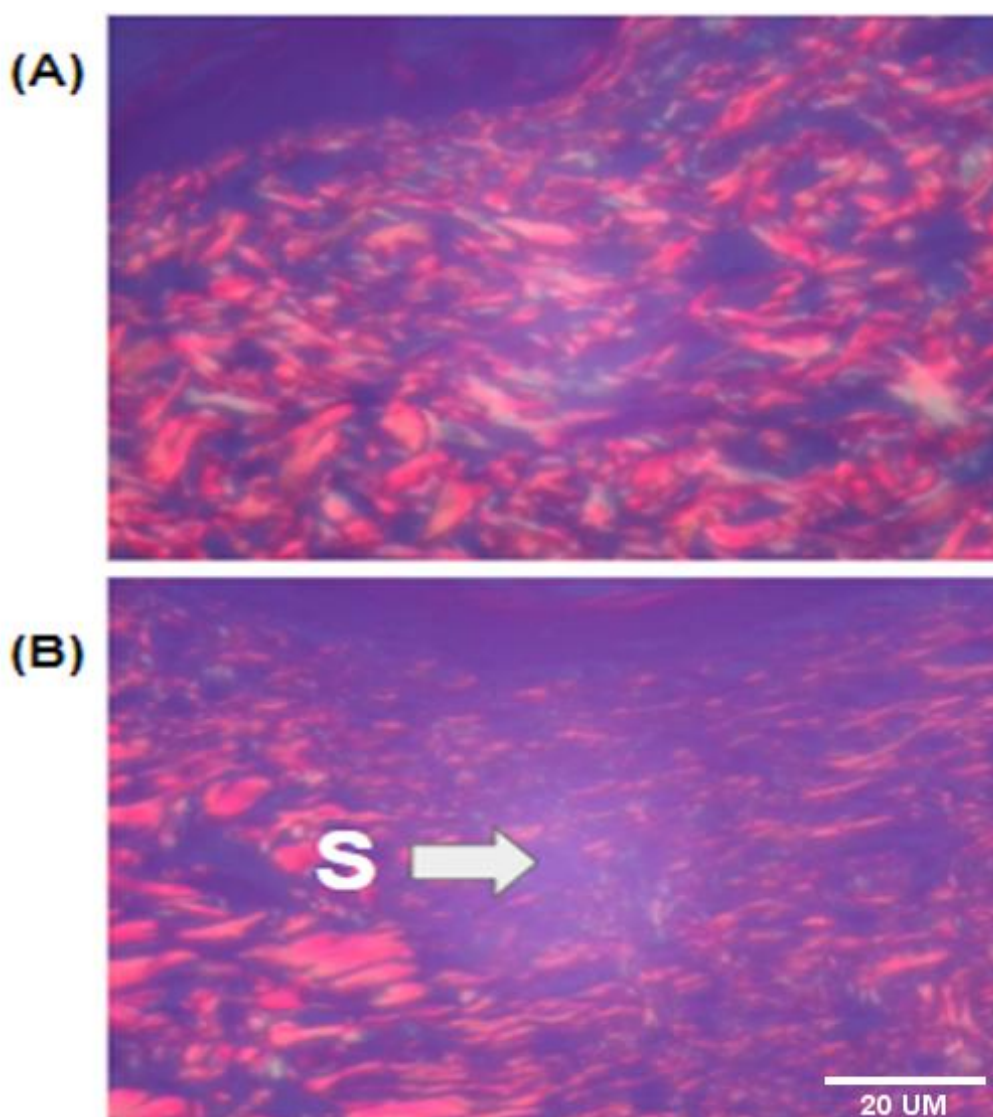
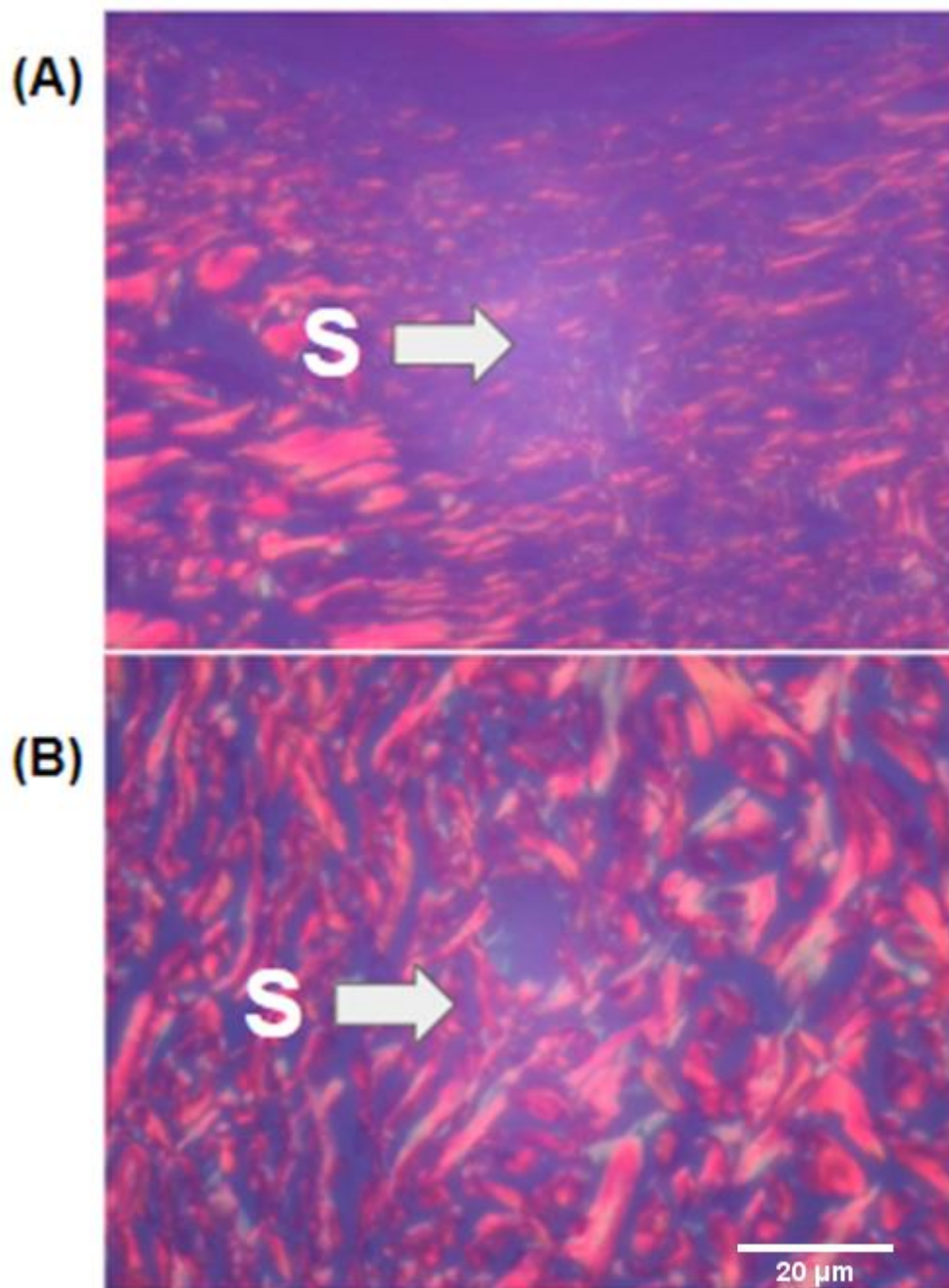


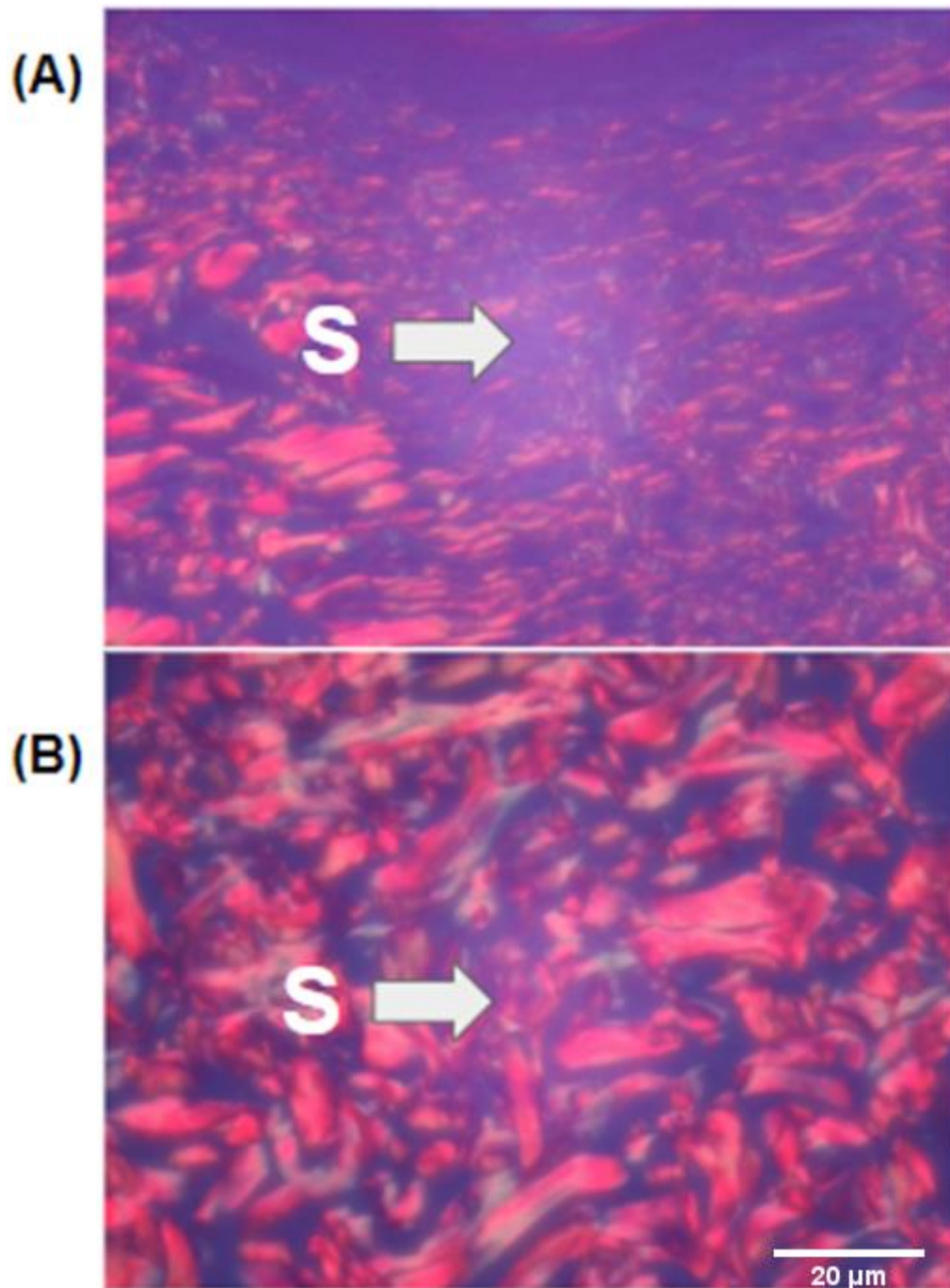
Figura 12: Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Corte transversal. Em (A) Grupo controle (CTL) e em (B) Grupo lesão sem tratamento (NT). Seta Branca - Região da Cicatriz. Região com tons de verde = colágeno III; Região com tons de rosa = colágeno I. Aumento 400X. Coloração: *Picrosirius*.

A figura 13A é uma imagem representativa do grupo lesão sem tratamento (NT) e a figura 13B do grupo lesão tratado com Diclofenaco de Sódio Tópico (DIC). Ao contrário do grupo NT, o grupo DIC apresenta distribuição homogênea dos tons de Rosa e Verde.



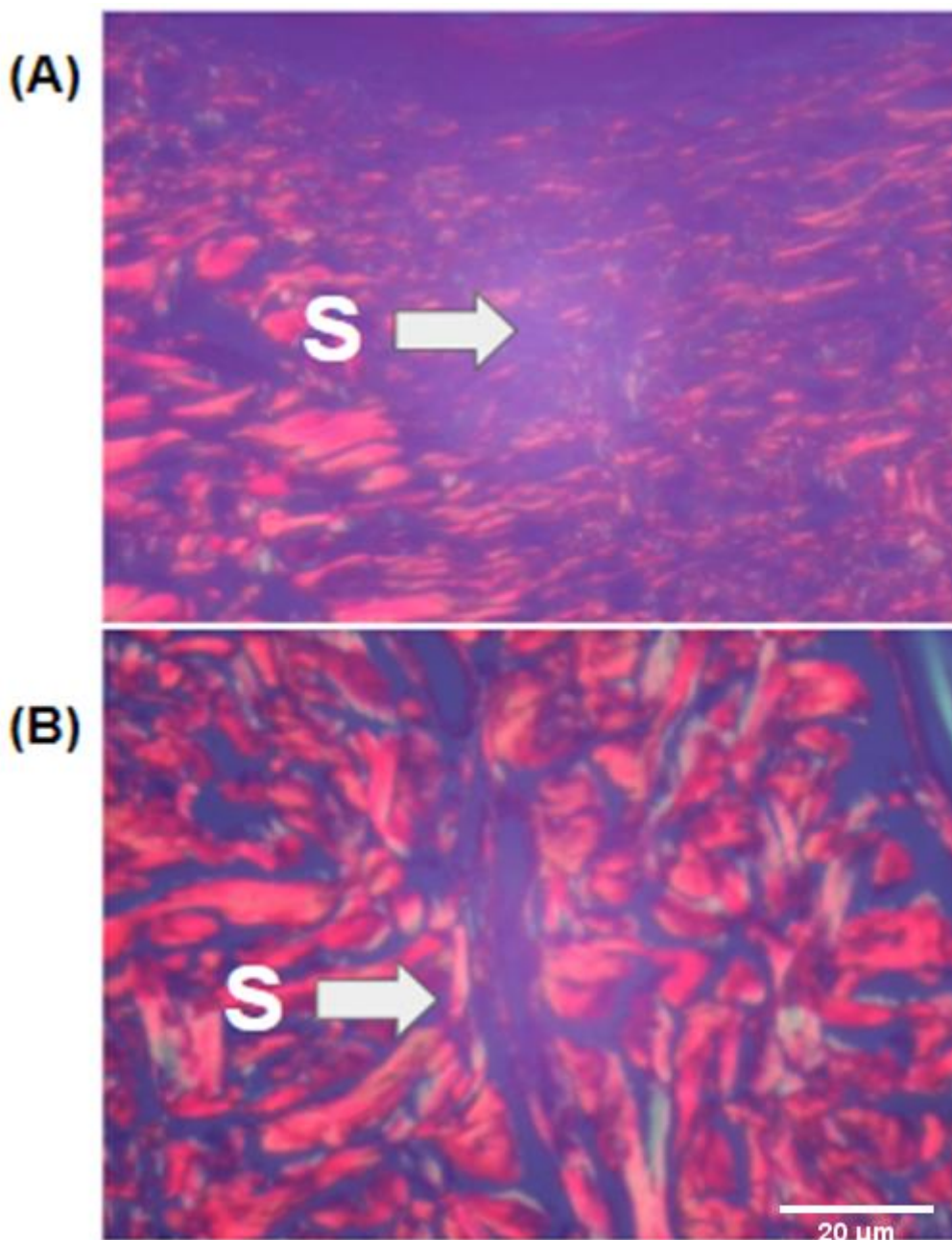
Na figura 13: Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Corte transversal. Em (A) Grupo lesão sem tratamento (NT) e em (B) Grupo lesão tratado com Diclofenaco de Sódio Tópico (DIC). Seta Branca - Região da Cicatriz. Região da Cicatriz. Região com tons de verde = colágeno III; Região com tons de rosa = colágeno I. Aumento 400X. Coloração: *Picrosirius*.

A figura 14A é uma imagem representativa do grupo lesão sem tratamento (NT) e a figura 14B do grupo lesão tratado terapia por fotobiomodulação (830nm, 1J, 100mW). No grupo PBM1J novamente é observada distribuição homogênea dos tons de Rosa e Verde, referente a proporção de colágeno I e III respectivamente.



Na figura 14: Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Corte transversal. Em (A) Grupo lesão sem tratamento (NT) e em (B) grupo lesão tratado terapia por fotobiomodulação (830nm, 1J, 100mW) (PBM1J). Seta Branca - Região da Cicatriz. Região da Cicatriz. Região com tons de verde = colágeno III; Região com tons de rosa = colágeno I. Aumento 400X. Coloração: *Picrosirius*.

A figura 15A é uma imagem representativa do grupo lesão sem tratamento (NT) e a figura 15B do grupo lesão tratado terapia por fotobiomodulação (830nm, 3J, 100mW). Assim como na figura anterior (12B), o grupo PBM3J novamente apresentou distribuição homogênea dos tons de Rosa e Verde, referente a proporção de colágeno I e III respectivamente.



Na figura 15: Fotomicrografia em Luz Polarizada da Pele de Ratos. Corte transversal. Em (A) Grupo Lesão sem tratamento (NT) e em (B) grupo lesão tratado terapia por fotobiomodulação (830nm, 3J, 100mW) (PBM3J). Seta Branca - Região da Cicatriz. Região da Cicatriz. Região com tons de verde = colágeno III; Região com tons de rosa = colágeno I. Aumento 400X. Coloração: *Picrosirius*.

#### 4.4 Quantificação da Proporção de Colágeno tipo I e III por Luz Polarizada.

O gráfico da Figura 16 apresenta a proporção de colágeno Tipo I (16A) e Tipo III (16B) a partir da análise das imagens histológicas, quantificadas pelo programa Image Pro Plus 10. Foram consideradas tons de rosa avermelhado para colágeno tipo I e tons de verde alaranjado para colágeno tipo III.

Na figura 16A, observamos a redução da proporção de colágeno tipo I no grupo NT e PBM3J quando comparado ao grupo CTL. Os grupos DIC e PBM1J mantiveram a proporção de colágeno tipo I semelhante ao grupo CTL. Na figura 16B, observamos redução na proporção de colágeno tipo III no grupo NT e DIC, quando comparado ao grupo CTL. Ambos os grupos irradiados com Laser em Baixa Intensidade (PBM1J e PBM3J) apresentaram aumento na proporção de colágeno tipo III quando comparado aos grupos CTL, NT e DIC. O grupo PBM3J apresentou expressivo aumento na proporção de colágeno tipo III quando comparado ao outro grupo irradiado (PBM1J).

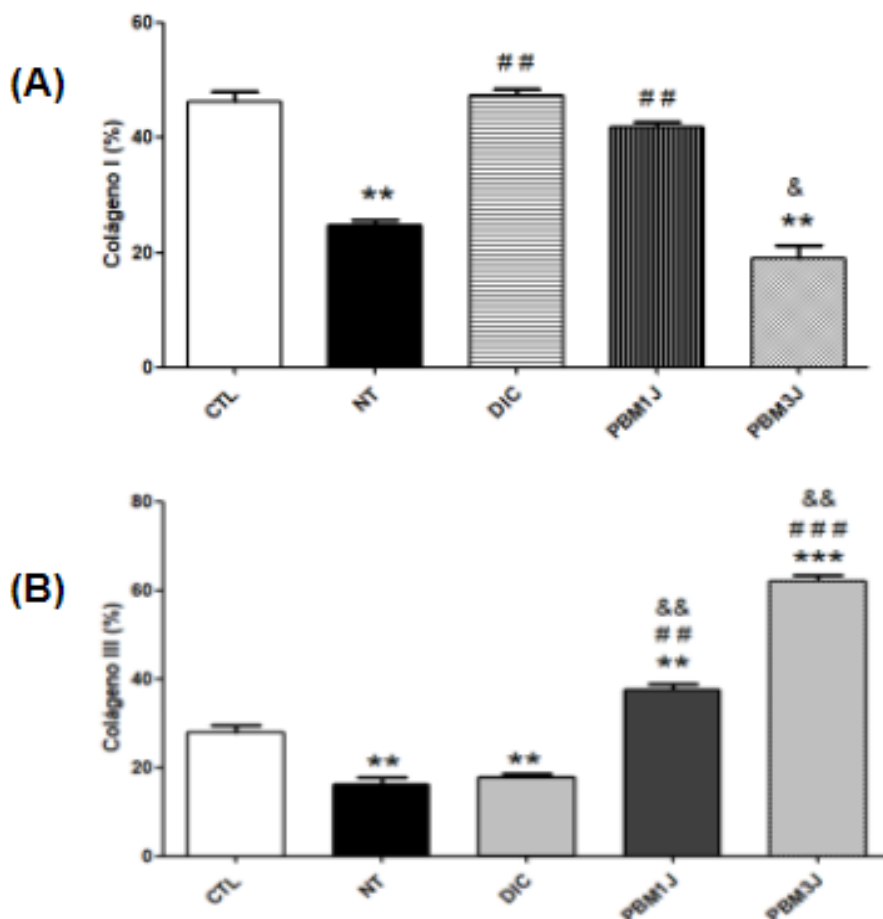


Figura 16: Gráfico da proporção de colágeno a partir da análise das imagens polarizadas de pele coradas com *Picrosirius*. Em (A) proporção de colágeno tipo I e em (B) proporção de colágeno tipo III. Grupos Experimentais: CTL (Controle) e lesão sem tratamento (NT) ou tratada com Diclofenaco tópico (DIC) ou com PBM em 1J ou em 3J. \*\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  VS CTL. ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  VS NT. &&  $p < 0,01$  VS PBM1J.

A figura 17 apresenta a relação entre as proporções de Colágeno tipo I e tipo III, a partir da análise das imagens histológicas, quantificadas pelo programa Image Pro Plus 10. Foram consideradas tons de rosa avermelhado para colágeno tipo I e tons de verde alaranjado para colágeno tipo III.

Podemos observar que o grupo NT apresentou menor proporção de ambos os colágenos Tipo I e III. Os grupos DIC e PBM1J apresentaram proporções semelhantes de colágeno tipo I, quando comparados ao grupo CTL, no entanto, o grupo PBM1J apresentou maior proporção de colágeno tipo III. O grupo PBM3J, apresentou proporção reduzida de colágeno tipo I, mas aumento na proporção de colágeno tipo III.

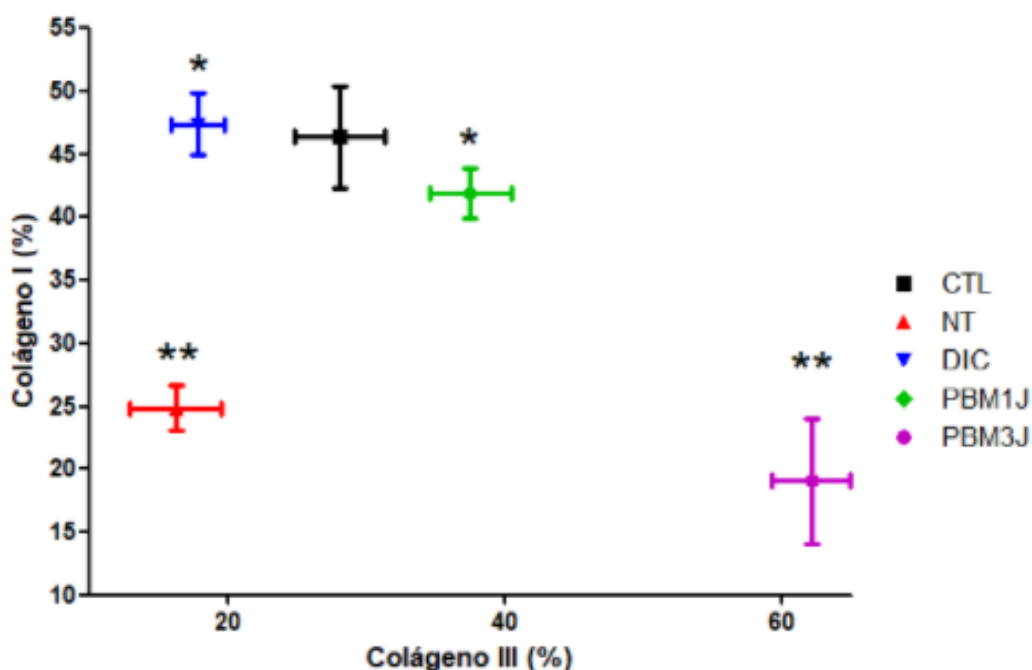


Figura 17: Gráfico da relação de colágeno tipo I e tipo III. Grupos Experimentais: CTL (Controle) e lesão sem tratamento (NT) ou tratada com Diclofenaco tópico (DIC) ou com PBM em 1J ou em 3J. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  VS CTL.



## 5- DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi observada os efeitos positivos da terapia por fotobiomodulação (PBM) sobre o reparo do tecido epitelial após indução de lesão por incisão cirúrgica, comparando os efeitos da PBM com grupos sem tratamento ou tratados com anti-inflamatório Diclofenaco de Sódio Tópico. O modelo experimental utilizado neste estudo, foi a indução da lesão cutânea a partir da incisão da pele por bisturi cirúrgico. Foi utilizado 5 diferentes grupos experimentais, o que possibilitou a comparação da evolução do reparo tecidual e a avaliação as características biomecânicas e morfológicas da pele após 4 semanas do momento da indução. A terapia de fotobiomodulação na energia de 1J (FBM1J) melhorou a organização tecidual e manteve a proporção de colágeno tipo I e III similar ao grupo controle (CTL). O grupo com lesão cutânea e sem tratamento (NT) apresentou redução das propriedades mecânicas durante ensaio cíclico de tração com presença de tecido desorganizado no local da lesão, além da redução na proporções de ambos os colágenos tipo I e III. O tratamento farmacológico, com Diclofenaco de Sódio Tópico (DIC) não interferiu nas propriedades mecânicas da pele, quando comparado ao grupo NT, porém auxiliou no aumento na proporção de colágeno tipo I.

O modelo de lesão cutânea utilizado neste trabalho é bem conhecido e simula cirurgias onde a incisão da pele é necessária, sendo uma intervenção simples, limpa e de rápida indução o que facilita sua reprodutibilidade pela padronização do tamanho do corte, favorecendo o uso e comparação dos resultados histológicos e biomecânicos nos diferentes grupos experimentais (64).

Neste trabalho também foi utilizado o teste de tração cíclica para determinação da propriedade mecânica da pele. Esta técnica foi adaptada do trabalho de Marcos *et al*, em que foi utilizado um ensaio cíclico de tração, com cargas crescentes de força aplicadas no tecido até sua ruptura. Neste modelo é possível avaliar a Força Máxima e a Deformação Máxima no momento da ruptura (26).

Complementando as análises histológicas, também foi utilizada neste trabalho a técnica de avaliação da proporção de colágeno, adaptado de Junqueira *et al*, onde utiliza-se imagens obtidas por filtros de polarização a partir de lâminas coradas com Picrosirius. Este ajuste na polarização da luz forma

basicamente tons de rosa avermelhado, que são indicativos indiretos da presença de colágeno tipo I. Da mesma forma, o tom verde alaranjado são indicativos indiretos de colágeno tipo III. As imagens são utilizadas em softwares específicos para quantificação dos padrões das diferentes cores (65).

Neste trabalho, foi observada a presença de tecido desorganizado na região da cicatriz, no grupo NT, quando comparado aos demais grupos tratados (DIC, PBM1J e PBM3J) ou ao grupo CTL. Foi também observado vasos sanguíneos formados na região da derme, especificamente na periferia da cicatriz. Ainda no grupo NT, foi observado alteração na proporção de Colágeno tipo I e tipo III sendo constatadas regiões escuras nas imagens histológicas coradas com Picrosirius, indicando redução de colágeno. De fato, após o processo lesivo, a pele perde vários componentes teciduais sendo necessário tempo para que células epiteliais e matriz extracelular específica seja novamente produzida e remodelada de acordo com o tecido original.

O tecido epitelial saudável possui diferentes camadas entre elas a derme, onde é possível observar presença de vasos sanguíneos e uma matriz extracelular organizada, composta por várias estruturas, entre elas o colágeno tipo I, III IV e V. Nas lesões do epitélio, a região da cicatriz pode apresentar infiltrado inflamatório além da presença de hemácias, caracterizando um quadro de hemorragia e perda de organização da matriz extracelular. A presença de vasos sanguíneos próximo às lesões cutâneas também são frequentes, sendo um indicativo do rearranjo tecidual e aumento do aporte sanguíneo favorecendo o reparo da pele (5, 66).

Na avaliação da proporção de colágeno, o grupo NT apresentou importante redução na proporção de colágeno tipo I e III quando comparado ao grupo CTL. Foram também observadas regiões escuras, indicando redução de colágeno total. A alteração ou desorganização de colágeno em regiões de lesão já é conhecida. Estudos experimentais com tecido tendíneo e ósseo demonstraram alterações do equilíbrio entre colágeno tipo I e III. Basicamente, o colágeno III são fibras mais finas, com características elásticas que podem sofrer transformações com o tempo, tornando-se mais espessas e resistentes, sendo esta proporção entre os tipos de colágeno, importante para a determinação das propriedades mecânicas do tecido (67). Ao comparar as informações da proporção de colágeno do grupo NT, observaram-se

modificações histológicas (presença de hemorragias e desorganização de matriz extracelular), justificando a redução nas propriedades mecânicas da pele neste modelo de lesão cutânea.

Foi incluído neste trabalho o grupo lesão com tratamento farmacológico, utilizando Diclofenaco de Sódio Tópico. A escolha deste fármaco tem relação com sua utilização em cirurgias, especificamente, no pós-operatório para fins analgésicos e na cicatrização de feridas (36). Neste trabalho, o grupo DIC apresentou tecido mais organizado quando comparado ao grupo NT, com presença de vasos na região periférica à incisão. O grupo DIC ainda não apresentou melhora significativa nas propriedades mecânicas, sendo similar ao grupo NT. Ademais, a proporção de colágeno tipo I foi expressiva neste grupo, indicando avanço no processo de reparo. Contudo, é sabido que a proporção entre os colágenos da matriz extracelular é um fator importante para a preservação das propriedades mecânicas dos tecidos, podendo interferir na resistência e rigidez, facilitando rupturas (67). Nossos resultados não demonstraram prejuízo das características funcionais da pele com o uso do DIC. Contudo, é importante avaliar outros aspectos moleculares, como a expressão de enzimas responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular com as Metaloproteinases de Matriz (MMP), uma vez que o desequilíbrio na proporção de colágeno pode promover aumento de MMPs específicas e alteração da resistência do tecido epitelial (36).

Ao analisar as amostras de pele dos animais tratados com terapia por fotobiomodulação, o grupo FBM1J apresentou resultados animadores comparado aos demais grupos. Primeiramente, foi observada presença de vasos no tecido de cicatrização, demonstrando um avanço no processo de reparo. Da mesma forma, foi observada melhora na organização tecidual, refletindo na proporção de colágeno tipo I e tipo III com valores semelhantes ao grupo Controle (CTL). O grupo FBM1J ainda apresentou propriedades mecânicas similares ao grupo controle demonstrando que a terapia por fotobiomodulação, nos parâmetros de 830nm, 1J e 100mW foi eficaz no avanço do processo de reparo neste modelo de lesão. O efeito da PBM no processo de reparo já foi apresentada em um trabalho de revisão apresentada por Gomes *et al* (2020) em que a fotobiomodulação com laser aumentou a expressão de colágeno tipo I modulando a resposta inflamatória (30).

Os efeitos angiogênicos da terapia por fotobiomodulação são conhecidos. Estudos experimentais utilizando laser de baixa intensidade no processo de reparo da pele já mostraram aumento de vascularização local associado ao aumento de fatores angiogênicos como VEGF (26). A FBM também auxilia na expressão de TGF- $\beta$ , com relação direta no aumento de colágeno (68).

Com relação aos efeitos da FBM sobre as propriedades mecânicas da pele, não foram encontrados até o momento estudos avaliando ensaios cíclicos de tração e a influência da FBM na Força e Deformação Máxima, no momento da ruptura. Contudo, a ação do laser de baixa intensidade na expressão de MMPs e seu impacto na melhora funcional já foi observado em estudos com tecido tendíneo (69). Em outro estudo Soleimani (2021) identificou melhora significativa entre os grupos controle e FBM sobre a tensão do tecido onde os grupos FBM se aproximaram dos resultados do grupo controle saudável (70).

Existem outros fatores que podem interferir na qualidade da cicatriz. Marcadores com o VEGF- $\beta$  ou ainda a elastina está diretamente relacionado com a organização da pele e conseqüentemente com suas características funcionais (71). Vale ainda ressaltar que o modelo de irradiação utilizado em trabalhos experimentais como este, a área irradiada no animal é expressiva quando comparamos ao tamanho do animal. Em estudos clínicos, este fator deve ser considerado, uma vez que não só a proporção da área, como também a quantidade de estruturas irradiadas é maior quando comparado no uso em humanos.

No modelo de lesão cirúrgica por bisturi, utilizado neste trabalho, o tecido periférico à lesão está sadio, o que favorece o processo de cicatrização em um tempo padrão. Seria interessante também avaliar o efeito da FBM no tecido epitelial em outros modelos como na Diabetes, na desnutrição ou em animais idosos, a fim de verificar se a fototerapia pode ser também utilizada com eficácia, na presença de outras doenças, com resultados positivos.

## **6- CONCLUSÃO**

Concluimos que a terapia por fotobiomodulação nos parâmetros (830nm; 1J; 100mW) foi eficaz no avanço do reparo tecidual, auxiliando tanto na organização tecidual como na proporção de colágeno tipo I e III, com reflexo direto na melhora das propriedades mecânicas da pele. A terapia farmacológica auxilia no avanço da organização tecidual, sem interferir na resistência da pele.

## 7. REFERENCIAS

1. Gravit L. Skin. Nature. 2018;563(7732):S83.
2. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. Experimental dermatology. 2016;25(2):92-8.
3. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nature reviews Microbiology. 2011;9(4):244-53.
4. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. Facial plastic surgery clinics of North America. 2011;19(2):229-34.
5. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. Physiol Rev. 2019;99(1):665-706.
6. Garcia Y, Wilkins B, Collighan RJ, Griffin M, Pandit A. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. Biomaterials. 2008;29(7):857-68.
7. VINAY K AA, FAUSTO N, ASTER JC. <ROBBINS-COTRAN-patologia-bases-patológicas-das-doenças-8ed.pdf>.
8. AC G, JE H. <Guyton - Tratado de Fisiologia Médica.pdf>. 13 ed. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER; 2017. 3333 p.
9. Blanes L. TRATAMENTO DE FERIDAS. São Paulo 2004. 23 p.
10. Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. Cells. 2019;8(6).
11. Yousef H, Alhaji M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

12. Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia. 3 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2008.
13. Cunha JLS, Carvalho FMA, Pereira Filho RN, Ribeiro MAG, de Albuquerque-Júnior RLC. Effects of Different Protocols of Low-Level Laser Therapy on Collagen Deposition in Wound Healing. Brazilian dental journal. 2019;30(4):317-24.
14. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. Plast Reconstr Surg. 2016;138(3 Suppl):18S-28S.
15. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. J Chin Med Assoc. 2018;81(2):94-101.
16. Vilela ALM. Sistema Tegumentar: estrutura do tegumento pele. Available from: <http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>.
17. Resende MA, Pereira LdSM, Castro MSdA. Proposta de um modelo teórico de intervenção fisioterapêutica no controle da dor e inflamação / Suggestion of theoretical model of physical therapy intervention about control of pain and inflammation. Fisioterapia Brasil. 2005;6:368-71.
18. Carvalho PdTCd, Mazzer N, Siqueira JFR, Ferreira JVL, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe. Fisioterapia Brasil. 2003;4:253-8.
19. Goebeler RGA. Chemokines in cutaneous wound healing. Journal of Leukocyte Biolog. 2001;69:513-21.
20. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. J Photochem Photobiol B. 2008;92(3):144-52.
21. Holm-Pedersen P, Viidik A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. 1972;6(1):24-35.
22. Oxlund H, Fogdestam I, Viidik A. The influence of cortisol on wound healing of the skin and distant connective tissue response. Surg Gynecol Obstet. 1979;148(6):876-80.

23. Kjaer M, Langberg H, Heinemeier K, Bayer ML, Hansen M, Holm L, et al. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scand J Med Sci Sports*. 2009;19(4):500-10.
24. Miller RT. Mechanical properties of basement membrane in health and disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;57-58:366-73.
25. Yin Z, Chen X, Zhu T, Hu JJ, Song HX, Shen WL, et al. The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair. *Acta Biomater*. 2013;9(12):9317-29.
26. Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-Martins RA. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;29:272-85.
27. You C, Wang X, Zheng Y, Han C. Three types of dermal grafts in rats: the importance of mechanical property and structural design. *Biomed Eng Online*. 2013;12:125.
28. Wang X, You C, Hu X, Zheng Y, Li Q, Feng Z, et al. The roles of knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. *Acta Biomater*. 2013;9(8):7822-32.
29. Biondo-Simões Mde L, Terranova O, Ioshii SO, Borsato KS, Weingärtner J, Nogueira G, et al. Effects of aging on abdominal wall healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2005;20(2):124-33.
30. Gomes BS, Bomfim FRCd, Lopes Filho GdJ. A Fotobiomodulação No Processo Cicatricial Da Pele - Revisão Da Literatura / Photobiomodulation in Wound Healing Process - Literature Review. *Brazilian Journal of Development*. 2020;6(9):66814-26.
31. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm*. 2019;2019:3706315.
32. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE, Weibel S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015;2015(6):Cd004123.
33. Hyldegaard O, Hedetoft M. [Hyperbaric oxygen therapy]. *Ugeskrift for laeger*. 2020;182(44).
34. Orgill DP, Bayer LR. Negative pressure wound therapy: past, present and future. *International wound journal*. 2013;10 Suppl 1(Suppl 1):15-9.
35. Gudmundsdottir I, Steingrimsdóttir S, Valsdóttir E, Gudbjartsson T. [Negative pressure wound therapy - review]. *Laeknabladid*. 2014;100(4):219-24.
36. Duman E, Ceylan KC, Akpınar D, Yücel N, Ünsal Ş, Duman S, et al. The effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on tracheal wound healing in an experimental rat model. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2020;30(4):646-51.
37. Silva Ebd, Maniscalco CL, Éspér GVZ, Guerra RR, Kerppers II. Análises macro e microscópicas de enxertos cutâneos por sementeira após laserterapia de baixa intensidade. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2013;40:44-8.
38. Endre Mester AFM, and Adam Mester. *The Biomedical Effects of Laser Application Lasers in Surgery and Medicine* 1985;5:31-9.
39. Van Breugel HHFI, & Bär, P. R. D. Power Density and Exposure Time of He-Ne Laser Irradiation Are More Important Than Total Energy Dose in Photo-Biomodulation of Human Fibroblasts In Vitro *Lasers in Surgery and Medicine*. 1992;12:528-37.
40. Pogrel MA, Chen, J. W., & Zhang, K. Effects of Low-Energy Gallium-Aluminum-Arsenide Laser Irradiation on Cultured Fibroblasts and Keratinocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1997;20:426-32.
41. Rocha Júnior AMea. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2007;6:pp. 257-65.

42. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13.
43. Fiorio FB, Albertini R, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. 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;29(1):313-9.
44. Khoo NK, Shokrgozar MA, Kashani IR, Amanzadeh A, Mostafavi E, Sanati H, et al. In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. *Avicenna journal of medical biotechnology.* 2014;6(2):113-8.
45. Ayuk SM, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660 nm. *Diabetes Technol Ther.* 2012;14(12):1110-7.
46. Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013;28(5):1305-13.
47. de Melo Rambo CS, Silva JA, Jr., Serra AJ, Ligeiro AP, Vieira RP, Albertini R, et al. 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.
48. Lima AA, Spinola LG, Baccan G, Correia K, Oliva M, Vasconcelos JF, et al. Evaluation of corticosterone and IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):709-15.
49. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(1):33-7.
50. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA, Jr., Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011;26(1):85-94.
51. Guerra Fda R, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci.* 2013;28(5):1281-8.
52. Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zetterqvist L, Rydén H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. *Swedish dental journal.* 1994;18(1-2):29-34.
53. Conlan MJ, Rapley, J. W., & Cobb, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation A review. , 23(5), 492–496. *Journal of Clinical Periodontology.* 1996;23:492-6.
54. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):344-51.
55. Dawood MS, Salman SD. Low level diode laser accelerates wound healing. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):941-5.
56. Da Silva AA, Leal-Junior EC, Alves AC, Rambo CS, Dos Santos SA, Vieira RP, et al. 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):210-6.
57. Mester A. Laser biostimulation. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(6):237-9.
58. Glass GE. Photobiomodulation: The Clinical Applications of Low-Level Light Therapy. *Aesthet Surg J.* 2021;41(6):723-38.
59. Neto FCJ, Martimbianco ALC, De Andrade RP, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS. Effects of photobiomodulation in the treatment of fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Lasers in Medical Science.* 2020;35(3):513-22.



60. Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *Journal of Diabetes Research*. 2016;2016:1-9.
61. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):885-91.
62. Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85:849-55.
63. Abreu JAdC, Sousa AdL, Alves CLGF, Nunes JT. Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser &[Abstract in English]&. *Scientia Medica*. 2011;21(3):96-100.
64. Calisto FC, Calisto SL, Souza AP, França CM, Ferreira AP, Moreira MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir Bras*. 2015;30(3):204-8.
65. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius Red Staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014;62(10):751-8.
66. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade ZDA, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *International wound journal*. 2018;15(2):274-82.
67. Silva RT. Efeito do laser de baixa potência (660nm) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos. TEDE uninove: Universidade Nove de Julho; 2016.
68. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):71-8.
69. de Medeiros ML, Araujo-Filho I, da Silva EM, de Sousa Queiroz WS, Soares CD, de Carvalho MG, et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci*. 2017;32(1):35-43.
70. Soleimani H, Amini A, Abdollahifar MA, Norouzian M, Kouhkheil R, Mostafavinia A, et al. Combined effects of photobiomodulation and curcumin on mast cells and wound strength in wound healing of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Lasers Med Sci*. 2021;36(2):375-86.
71. Gonçalves RV, Novaes RD, Matta SL, Benevides GP, Faria FR, Pinto MV. Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(5):597-602.

**Anexo I**

## Certificado do Comitê de Ética

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

São Paulo, 08 de dezembro de 2021  
CEUA N 3295160919

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Rodrigo Labat Marcos  
Área: Biofotônica Aplicada às Ciências Da Saúde

Título da proposta: "Estudo comparativo entre fotobiomodulação local e sistêmica em modelo experimental de lesão cutânea em animais diabéticos".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNINOVE (ID 000104)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 27/outubro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto está em andamento. Foi incluído o uso de Ácido Hialurônico e sua associação com PBM (Terapia por fotobiomodulação). A justificativa foi incluir uma terapia farmacológica já utilizada na clínica para comparação ao tratamento por Fotobiomodulação. Aproveitamos ainda para incluir um grupo com a associação entre as terapias (farmacológica e Fototerapia) a fim de avaliação possíveis efeitos somatórios. Em resumo, incluímos 2 grupos identificados como G6 e G7 somando mais 10 animais (8 animais por grupo). No final, soma-se 16 animais no projeto e passa de 40 para 56 animais. Foi corrigido o numero de animais de acordo com o Formulário, ficando igual ao projeto (56 animais) e foi realizada correção da dose de anestésicos."

Comentário da CEUA: "Emenda aprovada. Foi alterado o numero de animais de 40 para 56 ratos machos. ".

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho