



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - BIOFOTÔNICA

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE ÁCIDO HIALURÔNICO
NA RESISTÊNCIA DO TECIDO EPITELIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES – ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOMECÂNICOS**

José Maria Miguel Aguilera Cantero

São Paulo, SP
2025



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - BIOFOTÔNICA

José María Miguel Aguilera Cantero

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE ÁCIDO HIALURÔNICO
NA RESISTÊNCIA DO TECIDO EPITELIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES – ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOMECÂNICOS**

Tese apresentada ao programa
de Medicina Biofotônica da
Universidade Nove de Julho,

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP

2025

Cantero, Jose Maria Miguel Aguilera.

Efeito da fotobiomodulação associada ao uso de ácido hialurônico na resistência do tecido epitelial em modelo experimental de diabetes: aspectos morfológicos e biomecânicos. / Jose Maria Miguel Aguilera Cantero. 2025.

59 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

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

1. Fotobiomodulação. 2. Diabetes mellitus. 3. Ácido hialurônico. 4. Propriedades mecânicas.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 26 de junho de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO


Aluno (a): José Maria Miguel Aguilera Cantero

Título da Tese: “Efeito da fotobiomodulação associada ao uso de ácido hialurônico na resistência do tecido epitelial em modelo experimental de diabetes – aspectos morfológicos e biomecânicos”.

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



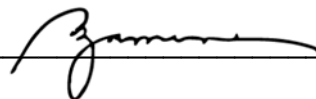
Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. JOSE LUIS GONZÁLEZ SOLÍS



Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE



DEDICATORIA

A meus Pacientes que confiam em mim, tanto na consulta, diagnóstico por imagens, e atos cirúrgicos. Por eles e que teve a escolha do caminho da Pesquisa, estudando como melhorar sua qualidade de vida.

A meus colegas e amigos, que sempre me apoiam e dão palmadas de continuar com este precioso caminho.

A Luz, ao Fóton, qual sem ele nosso trabalho não teria existido, e a todos os colegas do mundo inteiro que fazem com suas contribuições, um melhor lugar onde morar.

A esse imenso Creador, que fez o universo conhecido e seus mistérios, onde em uma data e horário, voltaremos a la luz infinita e mais brilhante possível, ser uno em todo, e todo em uno.

A todos vocês que estarão lendo este trabalho, e seja da melhor utilidade possível para cuidar unos de outros, e assim a humanidade progredir.

AGRADECIMENTOS

A meus Pais e Avós. Sinto muita felicidade por eles, porque seus sentimentos foram como semente para ser a pessoa que sou hoje.

A minha Esposa Karina, porque nestos 28 anos, o amor foi um componente fundamental da minha essência e a dela, permitir seguir meus sonhos, apoiando sempre sem questionar nada, comemorar as alegrias e otorgar alívio na tristeza, de coisas naturais da vida, e outras acontecidas por viver mesmo. Ela é meu refúgio, minha inspiração e a minha maior calificadora, mais tudo por esse amor que sempre permitiu poucas brigas e demais momentos felizes.

A meus filhos, Milagros e Inácio, que sempre me dão força para continuar neste caminho, sempre com muito amor e compreensão, onde a vezes seu aniversário passo longe, mais eles sabem que meu coração estão com eles. São os meus motores para andar todo o dia.

A meus Professores e Mestres da Universidade e Pós-graduação, souberam encontrar as minhas fraquezas, e com muita paciência mudaram isso em fortaleza. O Dr Jorge Gómez Otáñez, meu pai cirúrgico, até agora compartilha sala de cirurgia comigo, como se fosse uma relação Mestre e discípulo, que fica sem palavras, mais nos une o resto da vida.

Ao Professor Leonardo Longo, que sempre confiou no meu trabalho me formou em Laser, não tenho palavras de gratidão que possam graficar quanto estou orgulhoso de ser seu discípulo, também o Prof Toshio Oshiro, ensinando corrigindo tudo para ser melhor médico laser cada dia.

E finalmente a meu Orientador, Prof Rodrigo Labat Marcos, que teve a paciência, metodologia e, por sobre tudo, ser um incrível ser humano, com humanismo nas veias, tentando fazer a melhor versão de cada aluno, Gratidão eterna e imensa. Também a Dra Dominique Mello, que sempre me ajudou dentro e fora do laboratório, com uma qualidade científica e humana digna de ser reconhecida, muita gratidão por compartilhar estes anos.

A Prof Kris Porta, pelo apoio sempre a nosso projeto, muito grato.

*“E NO PRIMEIRO DIA, TUDO FOI OSCURIDADE, MAIS DEUS FALOU: FAÇA-SE A LUZ,
E ELA ILUMINOU A OSCURIDADE QUE ENVOLVIA A INMENSIDADE DO UNIVERSO”.
GENESIS 1:2.*

RESUMO

A Diabetes Mellitus é uma doença crônica não transmissível, que acomete grande parte da população mundial, com grande impacto socioeconômico relacionado aos gastos e comorbidades. A terapia por fotobiomodulação local (PBM) é um recurso utilizado na modulação do processo inflamatório e de reparo. O Ácido Hialurônico também é utilizado no cuidado da pele, contudo, seu uso associado a PBM é pouco conhecido. O Objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da PBM associada com o uso de Ácido Hialurônico subcutâneo na organização e resistência da pele em modelo experimental de Diabetes. Metodologia: Ratos Wistar machos foram randomizados e a Diabetes foi induzida pelo método de injeção de estreptozotocina e distribuídos em 5 grupos, a saber: Controle saudável (CTL); diabéticos sem tratamento (NT) e diabéticos tratados com (PBM) ou tratados com Ácido Hialurônico 2% diluído em gel de carboximetilcelulose (HA) ou diabéticos tratados com associação entre PBM e Ácido Hialurônico (PBM+HA). Foi utilizado laser com baixa intensidade, nos parâmetros de 660nm, 3J, 100mW em 3 pontos do dorso do animal, 2 vezes por semana, durante 30 dias, quando os animais foram eutanasiados e a pele do dorso foi dissecada e armazenada para análises morfológicas de quantificação de colágeno e funcionais para avaliação da resistência mecânica da pele. Resultados: Todos os grupos diabéticos reduziram a proporção de colágeno total. Foi observada alteração na proporção de colágeno tipo I e III nos grupos NT e HA acompanhado da redução das propriedades mecânicas (Fmax e Dmax). O grupo PBM manteve proporção de colágeno (Tipo I e III) e propriedades mecânicas (Fmax e Dmax) semelhantes ao grupo saudável (CTL). O grupo PBM+HA não apresentou resultado somatório, com resistência mecânica menor que o grupo NT. Conclusão: A diabetes altera a proporção de colágeno, refletindo na redução da resistência mecânica da pele. O HA altera a proporção entre colágeno tipo I e III, com aumento da rigidez tecidual. A PBM mantém a proporção de colágeno bem como a resistência mecânica da pele. Não foram observados efeitos somatórios no uso da terapia associada (PBM+HA).

Palavras-chave: Fotobiomodulação, Diabetes mellitus, Ácido Hialurônico, Propriedades mecânicas.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus it's a chronic metabolic non transmissible disease who involve a large world population nowadays. Always associated to great social and economics impact related thru their budget to treat it, as well to the comorbidities who involved this disease. A Local Photobiomodulation Therapy are a very usfull resource to treat the inflammatory process and wound healing. A Hyaluronic Acid are plenty use to modulate the inflammatory process, but his use jointed to Photobiomodularion are very uncommon, also unknow about the biological and metabolic process. This Research Objective was to evaluate the effect of the Local Photobiomodulation Therapy conjointed with subcutaneal application of Hyaluronic Acid, to test the Skin Resistance and Organization on experimental model of induced Diabetes in Winstar mice. Methodology: Male Winstar mice were ramdomized and they induce Diabetes with Stretozotocin inyections, and separated in 5 groups: 1. Healty, non Diabetic (Control Group), 2. Diabetic non Treated Group (NT group), 3. Diabetic Treated with Photobiomodulation (PBM group), 4. Diabetic Treated with Hyaluronic Acid 2% dilution on carboximetil cellulose gel. (HA group) and 5. Diabetic treated with Photobiomodulation plus Hyaluronic Acid (PBM + HA group). Was used a Low Level Laser emission with a setting of 660nm, 3J, 100mW, with appliance on three spots on the back's mice. After the mice were euthanized, the back's animal skin was separated and guarded for morphological, collagen proportion qualification and quantification, an mechanical properties of the skin removed. RESULTS: all Diabetic groups present a decreasing total collagen amount. Also was an alteration on the proportion of collagen I and III, concomitant with an alteration of mechanical properties on the NT and HA groups (Fmax and Dmax decreasing), The PBM group have maintained the collagen proportion I and III like the CTL group, with a maintenance of the Fmax and Dmax similliar to CTL and PBM group. A PBM + HA group didn't show relevant result, with mechanical resistance less than NT group. Conclusion: Diabetes disrupt the collagen proportion, diminished the skin mechanical resistance. HA makes skin more rigid, messes with Type I and III Collagen proportion. The PBM maintain the good collagen proportion as well for the mechanics properties. Non summatory effects was observed on the association of PBM + HA.

Key Words: Photobiomodulation, Diabetes, Hyaluronic Acid, Mechanical Properties s

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1, PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES DA DIABETES.....	13
FIGURA 2. Interrupção do processo normal de cicatrização de ferida no Diabetes.....	15
FIGURA 3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
FIGURA 4. GRÁFICO DO ENSAIO DE TRAÇÃO.	26
FIGURA 5. Propriedade mecânica da pele de F_{max}	29
FIGURA 6 - Propriedade mecânica da pele D_{max}	30
FIGURA 7: Gráfico da relação entre F_{max} e D_{max}	31
FIGURA 8- Imagens histológicas da pele de ratos.....	33
FIGURA 9- Proporção de Colágenos Tipo I e III.....	34
FIGURA 10- Imagens histológicas da pele de ratos. – Luz Polarizada.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PARAMETROS DE IRRADIAÇÃO.....25

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- AGEs: Produtos Finales de Glicosilação Avanzada.
- DM: Diabetes Mellitus.
- Dmax: Longitude Máxima de Deformação.
- DPP4 : Inibidores da Dipeptidil Peptidase.
- FBM: Fotobiomodulação.
- Fmax: Força Máxima de Deformação.
- GAGs: Glicosaminoglicanos.
- GLP=1: Péptido Semelhante ao Glucagon.
- HA: Ácido Hialurônico.
- HbGlicA1C: Hemoglobina Glicosilada A1C.
- HWM-HA: Ácido Hialurônico de Alto Peso Molecular.
- IDF: Federação Internacional de Diabetes.
- ILIB: Terapia de Irradiação Láser Intravascular do Sangue
- LWM-HA: Ácido Hialurônico de Baixo Peso Molecular.
- MEC: Matriz Extracelular.
- MMPs: Metamieloperoxidases.
- PBM: Terapia por Fotobiomodulação
- PCK: Proteína C Kinase.
- ROS: Especies Reactivas de Oxigénio.
- SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes.
- TTOG : teste de tolerância à glicose oral .
- VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial.

1- INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença metabólica que envolve múltiplas disfunções decorrentes da alteração do metabolismo da glicose, frequentemente associada a distúrbios lipídicos, como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, entre outros (1,2). Na diabetes, observa-se uma disfunção tanto no metabolismo da glicose quanto no das gorduras, o que leva a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ao desacoplamento da fosforilação oxidativa e ao acúmulo de produtos finais da glicação (AGEs) (5). Esses fatores, em conjunto, afetam o tecido epitelial, promovendo alterações fisiológicas, morfológicas e funcionais.

Os produtos resultantes desses desequilíbrios metabólicos também se manifestam nos componentes do tecido conjuntivo, especialmente na matriz extracelular (MEC), onde há aumento da atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs). Esse aumento promove alterações na proporção entre colágeno, comprometendo o processo de reparo tecidual em áreas lesionadas (6,7,8).

Atualmente, o tratamento da pele diabética é voltado principalmente para a manutenção da hidratação, a preservação da função de barreira, a redução da incidência de infecções e ao controle da neuropatia diabética sensitiva, cuja principal complicação é o pé diabético (9–13).

O uso de ácido hialurônico na pele diabética contribui para a hidratação, uma vez que se trata de um glicosaminoglicano (GAG), agindo na MEC por meio da modulação das hialuronidases de cadeia pesada e leve, favorecendo , sendo que uma dessas isoformas favorece a resolução da inflamação crônica, enquanto a outra exerce efeito oposto (14).

A fotobiomodulação tem se mostrado eficaz no tratamento da pele diabética, agindo na modulação de radicais livres, na transcrição de moléculas de reparo e componentes fibrilares, como o colágeno, promovendo a resolução da inflamação, sendo considerada uma abordagem promissora na regeneração do tecido conjuntivo e da pele em pacientes diabéticos (15).

Até o momento, há escassez de estudos que combinem a fotobiomodulação com o uso de ácido hialurônico. Nesse contexto, investigar essa associação terapêutica,

especialmente quanto à proporção de colágeno e suas repercussões nas propriedades mecânicas do tecido, torna-se fundamental. Tal investigação pode fornecer subsídios para interpretar, quantificar e propor um modelo de aplicação clínica voltado ao tratamento de lesões cutâneas em pacientes diabéticos.

2- REVISÃO DA LITERATURA

O diabetes mellitus é uma doença crônica não transmissível que ocorre quando o organismo não consegue utilizar a insulina de forma eficaz ou não a produz em quantidade suficiente. Cabe ressaltar que, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF) (1), desde o ano 2000 a prevalência estimada de diabetes na população entre 20 e 79 anos aumentou de 151 milhões (4,6% da população global à época) para 463 milhões (9,3%) atualmente. Sem medidas efetivas de prevenção, estima-se que, até 2030, cerca de 578 milhões de pessoas viverão com diabetes, o que corresponderá a 10,2% da população mundial (1,2,3).

De acordo com o estudo da IDF (1), o Brasil ocupava, em 2019, a 5ª posição entre os países com maior número de pessoas com diabetes, com 16,7 milhões de casos e uma prevalência de 10,4% entre indivíduos com mais de 65 anos. A projeção para 2030 é de 21,5 milhões de pessoas com diabetes (12% da população), colocando o Brasil na 4ª posição global, atrás apenas da Índia, dos Estados Unidos e da China (3,4).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), as mortes atribuídas ao diabetes em 2019 atingiram quase 136 mil pessoas na faixa etária de 20 a 79 anos. Já em 2008, o custo estimado para o Sistema Único de Saúde (SUS) com hospitalizações de pacientes com diabetes foi de 264 milhões de dólares, enquanto os gastos com amputações de membros inferiores somaram 128 milhões de reais. Ainda segundo a IDF, os custos totais relacionados ao diabetes em 2019 foram estimados em aproximadamente 52 bilhões de dólares, com previsão de aumento para cerca de 60 bilhões em 2030 (2,3,4).

O diabetes mellitus pode ser definido como um grupo de doenças metabólicas que têm em comum a hiperglicemia persistente. A hiperglicemia grave pode levar a sintomas como polidipsia, poliúria, perda de peso inexplicável, visão turva, cetoacidose ou

síndrome hiperosmolar não cetótica. A doença também pode ser compreendida como um distúrbio metabólico de etiologia heterogênea, caracterizado por hiperglicemia e alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, decorrentes de defeitos na secreção e/ou na ação da insulina (1–4).

O diagnóstico do diabetes é baseado na realização de exames como glicemia casual, glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose com sobrecarga de 75g de glicose (TOTG) e dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c) (6–11), esta última sendo considerada o principal exame para diagnosticar a diabetes tipo 2 (10,11).

2.1 Complicações da Diabetes

A hiperglicemia quando recorrente e persistente pode desencadear diversos danos aos tecidos, principalmente a partir da toxicidade da glicose nos vasos de menor calibre e nas terminações nervosas mais delicadas de extremidades e em alguns órgãos como rim, olhos e outros (Fig. 1). Os mecanismos que explicam esse dano são a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), a ativação da proteína cinase C (PKC), a hiperglicemia intracelular e os distúrbios na via de poliols (16, 17, 18, 19).

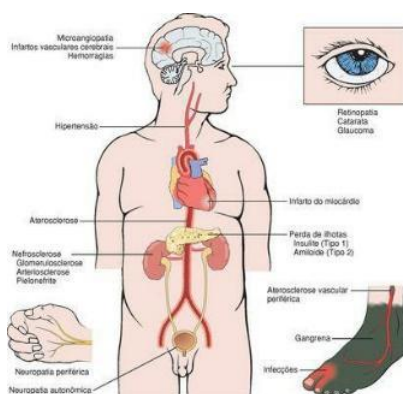


Figura 1: Principais complicações tardias do Diabetes Mellitus Fonte: Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças, 3114p(9).

As complicações da diabetes também estão relacionadas com a presença alterações microvasculares e macrovasculares, que podem progredir para alterações em diversos órgãos, como a retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica. A prevalência relatada de neuropatia

periférica relacionada ao diabetes varia de 16% a até 87% com neuropatia dolorosa relacionada ao diabetes relatada em cerca de 26% dos adultos com diabetes. O risco para complicações microvasculares, no passado estimava-se em torno de 10 a 20 vezes maior do que em indivíduos sem diabetes (12, 13, 17,18).

2.1.1- Relação da neuropatia periférica e sensibilidade

A neuropatia periférica é um dos sintomas da diabetes, sendo relacionada com alteração na sensibilidade, principalmente de membros inferiores, aumentando os riscos de lesões, infecções e amputações (1,2,12).

Estas alterações, quando acometem o pé do diabético “pé de risco”, geralmente são identificadas antes mesmo do aparecimento de lesões, sendo este reconhecimento precoce fundamental para o diagnóstico e tratamento adequado, reduzindo as complicações. Algumas intervenções, como a manutenção da hemoglobina glicada (HbA1c) abaixo de 7% pode reduzir em até 35% o risco de amputação. Além disso, duas abordagens são fundamentais na gestão desses pacientes: a conscientização e capacitação dos profissionais de saúde quanto ao manejo do pé de risco e a realização de triagens regulares para estratificação do risco (1–4, 10,11).

De acordo com o Ministério da Saúde, a avaliação do pé de risco deve ser realizada por um profissional de enfermagem capacitado, atuante na Atenção Básica, ao menos uma vez por ano. Essa avaliação tem como objetivo identificar possíveis perdas de sensibilidade e áreas com risco aumentado de lesão (4,11,13). As lesões no pé de risco estão comumente associadas a fatores como mau controle glicêmico, neuropatia periférica, doença arterial periférica, deformidades nos pés, traumas externos e edema periférico. Frequentemente, essas lesões têm origem na neuropatia periférica, que altera as pressões plantares, favorecendo a formação de calosidades. Assim, a base bioquímica da ulceração está relacionada a uma combinação de eventos que, em conjunto, promovem a degradação do tecido (13,16,17).

Estados hiperglicêmicos crônicos favorecem a formação de produtos finais da glicação (AGEs) e a liberação de citocinas inflamatórias, os quais induzem estresse oxidativo nas células nervosas. Esse processo resulta em neuropatias sensoriais, motoras

e autonômicas, sendo essas lesões comumente classificadas como úlceras neuropáticas (5,12,18,19).

2.1.2- Cicatrização e diabetes

A cicatrização de úlceras é um processo multifacetado que se inicia com a hemostasia, seguida por uma fase inflamatória. Trata-se de um fenômeno sistêmico e dinâmico, diretamente relacionado às condições gerais do organismo. As fases de reparo tecidual ocorrem, em geral, de forma sequencial; no entanto, há momentos em que essas fases se sobrepõem. É comum observar inicialmente a presença de neutrófilos, seguidos por macrófagos, que são responsáveis pela digestão de fragmentos celulares e pela amplificação da resposta inflamatória por meio da liberação de citocinas.

A fase proliferativa se sobrepõe à fase inflamatória, marcando o início da formação de novo tecido e vasos sanguíneos (angiogênese), além da construção da matriz extracelular que preencherá a lesão. Por fim, a fase de remodelação promove o fortalecimento da matriz, com reorganização das fibras colágenas e redução progressiva do fornecimento sanguíneo à área previamente lesionada (20,21).

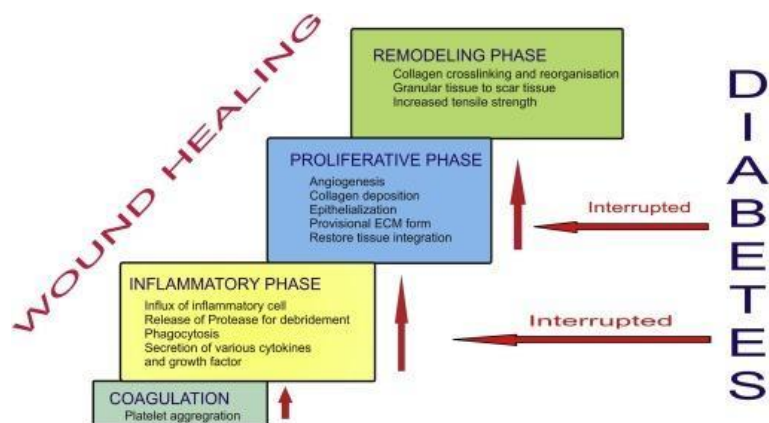


Figura 2: Interrupção do processo normal de cicatrização de ferida no Diabetes (22)

As úlceras diabéticas representam um desafio clínico importante, uma vez que o diabetes mellitus, condição de base, interfere negativamente em todas as fases do

processo de cicatrização: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Fig. 2). Essa interferência acarreta prejuízos significativos à qualidade de vida do paciente, além de aumentar os índices de morbidade e mortalidade. Feridas em pacientes diabéticos são frequentemente classificadas como feridas agudas ou crônicas de cicatrização retardada, em decorrência de um processo de cura adiado, incompleto ou descoordenado (22).

As feridas diabéticas podem ser classificadas em internas e externas, conforme sua forma de início. As feridas internas geralmente são precedidas por calosidades e alterações estruturais, enquanto as externas são causadas por traumas. No entanto, essas lesões externas podem ser negligenciadas devido à presença de neuropatia diabética, o que retarda o início do tratamento e favorece o desenvolvimento de infecções.

A abordagem terapêutica mais comum para essas lesões é tópica, utilizando produtos que promovem o debridamento autolítico, além de manter níveis ideais de umidade e temperatura, fatores fundamentais para um processo de cicatrização eficiente (21–23).

Lesões cutâneas induzidas por traumas, procedimentos cirúrgicos, queimaduras ou infecções estimulam a liberação de diversas substâncias químicas envolvidas na inflamação aguda. Esse processo desencadeia alterações teciduais que incluem migração celular, proliferação de células estromais e síntese de matriz extracelular, direcionando o tecido para a fase de remodelação. Essas lesões podem atingir múltiplas estruturas, comprometendo a continuidade da integridade tecidual e modificando propriedades específicas do tecido acometido (23,24).

2.1.3- Cicatrização e colágeno

As alterações nas propriedades mecânicas da pele após um processo lesivo ou tratamento começaram a ser mais bem compreendidos nos últimos 50 anos, a partir dos estudos de Oxlund (25), que demonstraram a importância do colágeno na resistência da pele. O colágeno, sintetizado pelas células, exerce papel fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo o principal responsável por suas propriedades físicas.

As fibras de colágeno apresentam organização específica de acordo com o tipo de tecido biológico, e essa organização pode sofrer alterações significativas após um processo lesivo (25–27). Tais modificações, tanto quantitativas quanto qualitativas, afetam diretamente as propriedades mecânicas do tecido. Assim, não apenas a concentração total de colágeno, mas também a proporção entre os diferentes tipos de colágeno, e a organização das fibras, é determinante na resistência tecidual, especialmente em indivíduos idosos (28,29).

2.1.4- Angiogênese no Reparo da Pele

Durante o processo de reparo da pele, assim como em outros tecidos, ocorrem mudanças nos componentes celulares e estruturais. Nessas condições, observa-se um aumento na concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na região a ser regenerada, marcando o início do processo de angiogênese. Neste processo, ocorre a expansão da rede vascular preexistente, na qual a migração, o crescimento e a diferenciação das células endoteliais devem ocorrer de forma precisa e controlada.

O desenvolvimento e a expansão da rede vascular estão diretamente relacionados a diferentes condições metabólicas e mecânicas, o que resulta em distintos subtipos de células endoteliais envolvidas na angiogênese. No entanto, até o momento, a caracterização detalhada desses subtipos permanece limitada (30).

Estudo pré-clínicos indicam que as células endoteliais venosas são a principal fonte da resposta angiogênica, tanto em modelos embriológicos quanto em patologias adquiridas. Essas células têm a capacidade única de migrar contra o fluxo sanguíneo, possibilitando a formação de uma nova rede vascular. Alterações nesse processo podem levar a anomalias vasculares, como a malformação arteriovenosa, ou à proliferação vascular excessiva, como ocorre na retinopatia diabética (31).

O modelo tradicional de angiogênese aplicado à pele considera a hipóxia como principal estímulo para a formação de novos vasos. Inicialmente, o estímulo hipóxico induz a produção de VEGF-A, que promove a reorganização do complexo de Golgi nas células endoteliais, direcionando sua secreção para as áreas com menor oxigenação. Isso desencadeia a migração, proliferação e diferenciação das células endoteliais oriundas de

vênulas, formando estruturas do tipo “célula ponta”, que avançam em direção ao gradiente hipóxico, visando restaurar a oxigenação do tecido afetado.

Para que essas mudanças ocorram, é necessário liberar espaço no tecido, o que envolve a degradação da matriz extracelular preexistente, especialmente por meio da ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e da ruptura das membranas basais na região sinalizada pelo aumento do VEGF. Além disso, há ativação da resposta pró-inflamatória, com participação de macrófagos e linfócitos T, que contribuem para a liberação adicional de MMPs. As células endoteliais venosas são, portanto, a principal fonte celular para a migração e expansão da nova rede vascular (30,31).

2.2- Tratamentos para lesões de pele

Apesar dos avanços no entendimento das diversas fases do reparo tecidual, a incidência e a prevalência de úlceras crônicas continuam extremamente elevadas. Diversos fatores influenciam negativamente o processo de cicatrização da pele, especialmente em indivíduos com diabetes mellitus e em pessoas idosas.

Estatísticas recentes demonstram que os gastos com tratamento de feridas chegam a aproximadamente 750 milhões de euros por ano na Europa. Nos Estados Unidos, esse valor alcança 600 milhões de dólares anuais (EWMA/WUWHS). No Brasil, há poucos dados estatísticos precisos sobre o número de portadores de feridas cutâneas crônicas; no entanto, sabe-se que a cronificação de lesões na pele tem impacto significativo nos âmbitos psíquico, social e econômico, sendo a segunda principal causa de afastamento do trabalho. Pode-se inferir que a maioria dos casos de lesões crônicas na pele está associada ao envelhecimento populacional, às lesões por pressão e às úlceras vasculares. Esses dados justificam a importância crescente da realização de estudos mais abrangentes sobre o tema, com o objetivo de minimizar o estigma social e os custos econômicos relacionados às feridas crônicas no país (32,33).

Atualmente, existe uma ampla variedade de coberturas e tratamentos disponíveis no manejo de feridas, com o objetivo de acelerar o fechamento das lesões. Entre os recursos mais utilizados, destacam-se: alginatos de cálcio e sódio, hidrofibras com ou sem prata, espumas de poliuretano associadas à prata ou ao ibuprofeno, entre outras

opções oferecidas pelo mercado. Além disso, HA terapias avançadas, como a terapia por pressão negativa, que utiliza coberturas especiais conectadas a dispositivos que promovem a retirada do exsudato por pressão subatmosférica, a ozonioterapia e a oxigenoterapia hiperbárica, que aumenta a concentração de oxigênio nos tecidos e favorece a cicatrização.

De modo geral, os tratamentos visam à remoção do tecido lesado e ao estímulo da formação de um novo tecido que atenda às exigências anatômicas e funcionais da pele. Contudo, são limitadas as terapias que promovam a formação de tecido cicatricial com propriedades mecânicas e estéticas equivalentes às do tecido original. Essa limitação reforça a necessidade de desenvolver e investigar novas estratégias terapêuticas capazes de promover uma regeneração epitelial mais fiel à estrutura e funcionalidade originais da pele.

2.3- Tratamentos da Diabetes

2.3.1- Tratamentos convencionais

O tratamento farmacológico é atualmente o mais utilizado e, dependendo do paciente com diabetes e dos níveis glicêmicos apresentados, são utilizados hipoglicemiantes orais, como a metformina, as sulfonilureias, as glitazonas e os inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), também conhecidos como gliptinas. Além desses, fazem parte do arsenal terapêutico as insulinas de ação rápida e lenta, bem como os análogos do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1).

Entretanto, é importante destacar que nem todos esses medicamentos estão amplamente disponíveis ou são de fácil acesso em todas as regiões, o que pode comprometer a adesão ao tratamento e o controle glicêmico adequado (3,4,33,34).

2.3.2- Terapia por fotobiomodulação

Vários estudos demonstram que o uso da fotobiomodulação tem apresentado resultados promissores em diferentes tratamentos relacionados às complicações do diabetes. Entre esses, destaca-se a terapia de fotobiomodulação sistêmica não invasiva,

conhecida como ILIB (Intravascular Laser Irradiation of Blood), aplicada em diversas situações clínicas, com resultados positivos na melhora da microcirculação, bem como no controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 (35). Contudo, embora haja um reconhecimento crescente quanto à eficácia da fotobiomodulação no tratamento da diabetes, o mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido, sendo necessários mais estudos que permitam sua compreensão (5, 35–37). Podemos também considerar o alto custo do tratamento convencional para o diabetes, o que justificaria a busca de terapias adjuvantes que não apenas auxiliem na abordagem clínica, mas também aumentem a adesão dos pacientes.

A terapia com laser de baixa potência é amplamente conhecida por sua ação na fase inflamatória do processo de cicatrização, promovendo a ativação de queratinócitos e a síntese de colágeno. Dessa forma, contribui tanto para a resolução da inflamação quanto para o reparo tecidual, melhorando a qualidade histológica da pele (36–42).

Os primeiros estudos sobre o uso do laser de baixa intensidade no reparo tecidual, realizados por Mester (39), Van Breugel (40) e PoGrel (41), foram fundamentais para o reconhecimento desta técnica terapêutica pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos como método eficaz na promoção da cicatrização (35–42).

O efeito reparador da fotobiomodulação deve-se a uma série de modificações histológicas, incluindo a redução do infiltrado inflamatório, o aumento do tecido de granulação e da epitelização, a proliferação de fibroblastos e a síntese de matriz extracelular rica em colágeno, além do estímulo da neovascularização. Tais alterações também podem promover uma maior expressão de colágeno durante o processo cicatricial (41–43).

Estudos recentes demonstraram o potencial do laser no aumento da expressão de colágeno tipo I e na reorganização das fibras colágenas. Evidências também indicam que a fotobiomodulação pode modular a resposta inflamatória ao reduzir a expressão gênica de mediadores inflamatórios, como PGE2, IL-1 β e TNF- α , e aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (46–48).

Além disso, a fotobiomodulação pode reduzir a expressão de determinadas collagenases (metaloproteinases de matriz – MMPs), diminuindo a degradação tecidual e

favorecendo o rearranjo das fibras colágenas. Esse efeito contribui para a melhora das propriedades biomecânicas dos tecidos, especialmente em regiões com baixa vascularização durante o processo de cicatrização (42, 48–50).

Quanto ao comprimento de onda, estudos iniciais demonstraram maior eficácia do laser vermelho no reparo de feridas em comparação ao laser infravermelho (49, 51–53). No entanto, Reddy e colaboradores observaram, em modelo experimental com animais diabéticos, que o laser infravermelho foi capaz de aumentar a resistência à tração e a integridade mecânica da pele (51–56).

Nos últimos anos, diversos estudos buscaram demonstrar a viabilidade da terapia com laser de baixa intensidade. Contudo, ainda não há um padrão metodológico consolidado que permita a comparação direta entre os resultados (15, 27, 35–39, 45–56).

Diante do exposto, evidencia-se a importância de estudos que investiguem os parâmetros e mecanismos de ação da terapia por fotobiomodulação no reparo tecidual, bem como sua eficácia em indivíduos diabéticos. O presente estudo propõe-se a contribuir para esse entendimento, possibilitando, no futuro, a incorporação dessa abordagem às estratégias terapêuticas no tratamento do diabetes.

2.3.3- Terapia com o Uso do Ácido Hialurônico no Reparo da Pele

O ácido hialurônico é um componente natural da matriz extracelular dos tecidos, especialmente do tecido conjuntivo e da derme, embora também exerça importantes funções na epiderme, atuando como facilitador do reparo tecidual, estimulador da atividade dos fibroblastos e modulador de outras células epidérmicas, como as células de Langerhans. O HA também desempenha um papel relevante no processo de cicatrização, influenciando na fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (57). A apresentação natural do Ácido Hialurônico é um líquido, que cumpre com todos os critérios de Glicosaminoglicanos; mais o utilizado nas aplicações médicas e estéticas são os que apresentam uniones tipo Cross-Linked de diversos tipos, quando mais apresentarem, mais e o grau de reticulação deles e, por enquanto, a degradação deles acontece em maior tempo, não tendo a curva natural de degradação daquele produzido pelo organismo. O mecanismo de Cross-Linked ajuda a retenção de maior quantidade de água, hidratando o

tecido alvo da aplicação dele. Os usos mais frequentes são em forma de tópico na pele, assim como aplicação intradérmica ou subdérmica segundo os fins do tratamento.

Um dos efeitos do Ácido Hialurônico está na promoção da reepitelização epidérmica, efeito este atribuído à ativação dos queratinócitos, bem como à indução da produção de proteínas pró-inflamatórias, que participam das fases iniciais do reparo cutâneo (59). Importante destacar que, apesar dessa ativação, não há aumento significativo de eritema na região tratada, especialmente na derme (57,58).

O ácido Hialurônico, quando aplicado intradérmico, pode ser metabolizado, originando moléculas de alto peso molecular (HMW-HA) e de baixo peso molecular (LMW-HA). As moléculas de alto peso molecular exercem funções predominantemente imunossupressoras e anti-inflamatórias, enquanto as de baixo peso molecular têm ação imunoestimulante, contribuindo para a continuidade da fase inflamatória do processo de cicatrização (59).

3- OBJETIVO

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação associada ao uso de Ácido Hialurônico na proporção de colágeno e na manutenção das propriedades mecânicas em modelo experimental de Diabetes induzida por Estreptozotocina em ratos.

3.1- Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da diabetes induzida na proporção de colágeno e resistência da pele de ratos.
- Comparar a terapia com Ácido Hialurônico e com Fotobiomodulação utilizadas de forma isolada ou associadas na proporção de colágeno e sua influência na resistência mecânica da pele de ratos com diabetes induzida.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais e fatores éticos.

Para o presente estudo foi utilizado o total de 25 ratos Wistar “*Rattus Norvegicus Albinus*”, machos com idade aproximada de 6 meses, peso em média 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade e com ração e água em “*ad libitum*”.

Todos os procedimentos em animais foram realizados no Laboratório da UNINOVE de acordo com o guia de “Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, com a aprovação do Comitê de Ética Animal da UNINOVE CEUA Nº 3295160919.

4.2- Delineamento Experimental

Os animais foram randomizados manualmente e distribuídos em 5 grupos com 5 animais por caixa. Os animais dos grupos NT, PBM, HA e PBM+HA foram anestesiados e a diabetes foi induzida por injeção única de estreptozotocina (Intraperitoneal). A glicemia com acompanhada por 5 dias. Os animais considerados diabéticos retornaram para as caixas (N=5). Os tratamentos com ácido hialurônico (HA = 2% subcutâneo), Fotobiomodulação (PBM = 660nm, 3J, 100mW) e terapias associadas (PBM+HA) começaram no 5º dia e seguiram 2 vezes por semana até completar 30 dias de tratamento, quando os animais foram eutanasiados e a pele coletada para análises biomecânicas e morfológicas.

4.3- Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais, a saber (Figura 3):

- Controle saudável (CTL);
- Diabéticos sem tratamento (NT);
- Diabéticos tratados com PBM - 660nm, 3J, 100mW em 3 pontos do dorso do animal, 2 vezes por semana, durante 30 dias (PBM);
- Diabéticos tratados com Ácido Hialurônico – HA: 2% diluído em gel de carboximetilcelulose, 1 vez por semana, durante 30 dias;
- Diabéticos tratados com associação PBM e Ácido Hialurônico (PBM+HA)

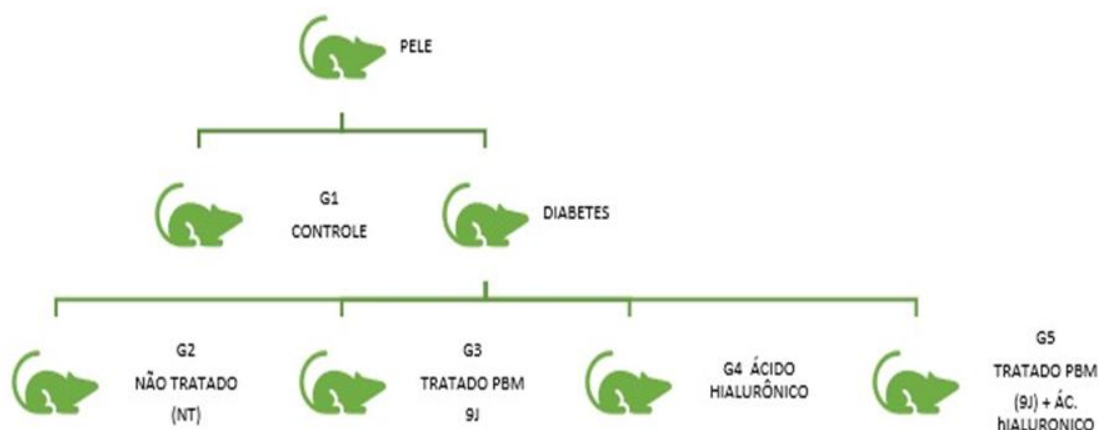


Figura 3- Grupos experimentais

4.4- Técnicas Operatórias

4.4.1- Anestesia e Eutanásia.

Para a realização da indução da diabetes, os animais foram anestesiados com injeção da associação de cloridrato de Cetamina e Xilasina (90mg/kg e 10mg/Kg).

Após 8 semanas, no final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com hiperdose da mesma associação de anestésicos Cloridrato de Cetamina e Xilasina (270mg/kg e 30mg/Kg) e 2 amostras da pele do dorso foram coletadas com um punch de 10mm de diâmetro e em seguida foram armazenadas em freezer -80° para avaliação das propriedades mecânicas ou armazenadas no formol 10% para avaliação histológica.

4.4.2- Indução da Diabetes

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com associação de cloridrato de xilasina e quetamina (90mg/Kg e 10mg/Kg). Após a anestesia foi injetada 45 mg/Kg de estreptozotocina (IP). Os animais foram mantidos em sala pós-cirúrgica até o término da anestesia onde foram distribuídos em caixas com no máximo 5 animais cada. Todos os animais foram tratados com solução de glicose 10% via oral por 24 horas. A análise de glicemia foi realizada por fita de glicemia padrão até o 5º dia da indução da Diabetes. Foi considerado diabético o animal que na última leitura de glicemia, apresentar valor superior a 300 mg/dl. A seguir os animais retornaram para

as caixas e foram distribuídos em 5 grupos experimentais, descritos em 2.1.2.

4.5- Tratamentos

Todos os tratamentos foram iniciados na semana seguinte à indução da Diabetes e mantidos por 30 dias a partir do diagnóstico de diabetes.

4.5.1- Aplicação do Ácido Hialurônico

Os animais foram imobilizados com contensor de acrílico. No dorso central do rato, foi realizada 3 marcações com caneta para padronizar a injeção de Ácido Hialurônico. Foi utilizado 3 pontos na região central do dorso, com distância de 10mm entre cada ponto. Em seguida, os animais receberam injeção no volume de 100µl de Ácido Hialurônico (2% diluído em gel de carboximetilcelulose). O tratamento foi repetido 1 vez por semana, durante 30 dias.

4.5.2- Aplicação da PBM

O animal foi mantido em contensão. Foi realizada aplicação do laser de baixa intensidade nos parâmetros de 660nm, 3J, 100mW em 3 pontos do dorso do animal, 2 vezes por semana, durante 30 dias (PBM), segundo a Tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros de Irradiação

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda central (nm)	660
Largura espectral (FWHM) (nm)	1
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média (mW)	100
Área na saída (cm ²)	0,0200
Irradiância na abertura (mW/cm ²)	5000
Tamanho do feixe no alvo (cm ²)	0,0200
Irradiância no alvo (mW/cm ²)	5000
Tempo de exposição (s)	30
Exposição radiante no alvo (J/cm ²)	150
Energia radiante por ponto (J)	3
Número de pontos irradiados	3
Área irradiada por sessão (cm ²)	0,06
Energia radiante por sessão (J)	9,0
Técnica de aplicação	Em contato
Frequência das sessões	1
Número de sessões	1
Energia radiante total (J)	9,0

4.6- Análises

4.6.1- Propriedades mecânicas da pele

Os animais de todos os grupos foram sacrificados após 8 semanas do início do tratamento e retalhos da pele (N=5) na região dorsal onde foi induzida a incisão, cirúrgica, com dimensões de 5mm de largura e 10mm de comprimento, foram removidos para posteriores análises. Parte deste material foi utilizada imediatamente após a retirada em 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 4A).

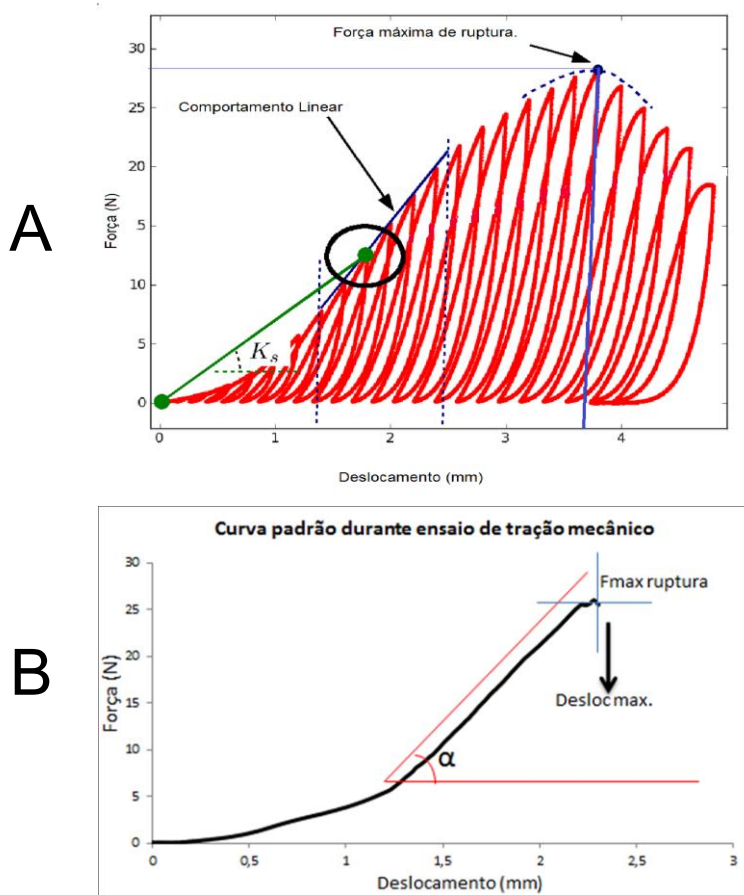


Figura 4: Gráfico do ensaio de tração. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.

Primeiramente foram realizadas as medidas de comprimento, largura e altura do retalho. Estes valores foram utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. Cada extremidade da pele foi fixado em grampos para cada extremidade do retalho de pele, no aparelho de ensaio mecânico (EMIC200). Vários testes de carregamento e descarregamento de forças foram realizados até o momento da ruptura do tecido, conforme indicado na figura 3 abaixo.

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 4B), 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})

4.6.2- Preparação Histológica das amostras de pele

As amostras de pele (N=5) 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 5µm e transferidos para lâminas histológicas aonde foram desparafinizadas e hidratadas. As lâminas foram coradas com *Picrosirius*, para visualização do colágeno total. Foi utilizada lente de polarização para quantificação de colágeno tipo I e tipo III.

4.6.3- Quantificação de colágeno

Para a quantificação do colágeno total, as lâminas coradas com *Picrosirius* foram fotografadas com objetiva de 40X e as imagens foram armazenadas para quantificação com a utilização de rotinas construídas com o programa Image Pro Plus 5. Para a quantificação de colágeno tipo I e III, foi utilizado filtro de polarização com 45°, até que o fundo da lâmina ficasse totalmente escuro e o tecido da pele apresentasse tons entre rosa e verde. O programa Image Pro Plus identifica o tipo de colágeno a partir da marcação de cores em tons de verde e rosa, fornecendo o resultado em pixels. Os tons de Vermelho,

amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto que o verde é igual a colágeno tipo III (imaturo). A quantificação da área para cada tipo de colágeno foi expressa em Pixels e porcentagem. Foram consideradas 5 imagens para cada lâmina.

4.6.4- Análise estatística

Para as propriedades mecânicas, 5 amostras de pele foram utilizadas. Os dados numéricos de Fmax (N) e Dmax (mm) foram utilizados para a confecção dos gráficos. As imagens histológicas fotografadas em microscópio óptico em luz polarizada foram utilizadas no programa Image Pro Plus e a quantificação dos tons vermelho e verde (pixels) foram transformadas em porcentagem, considerando a porcentagem total da amostra em cada lâmina histológica. Foi utilizado análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey a partir das médias e desvio padrão da média. Foi utilizado o software estatístico GraphPad Prisma 8. O nível de significância estatístico foi considerado para valores com $p < 0,05$.

5- RESULTADOS

Os resultados foram organizados em:

- Propriedades Mecânicas da Pele, com os valores da Força máxima de compressão (Fmax) em Newtons e Capacidade máxima de deformação (Dmax) em milímetros.
- Quantificação de Colágeno a partir de lâminas coradas com *Picrosirius*, sem polarização para quantificação total de colágeno e com polarização para quantificação de colágeno tipo I e III em porcentagem (%).

5.1- Quantificação da Força Máxima no momento da ruptura (Fmax)

Na figura 5, observa-se a redução de Fmax no grupo com diabetes induzida e sem tratamento (NT) bem como no grupo com terapias associadas (PBM+HA). O grupo HA apresentou aumento de Fmax quando comparado tanto ao grupo (NT) como com o grupo (PBM). O grupo tratado com PBM apresentou Fmax similar ao grupo saudável (CTL).

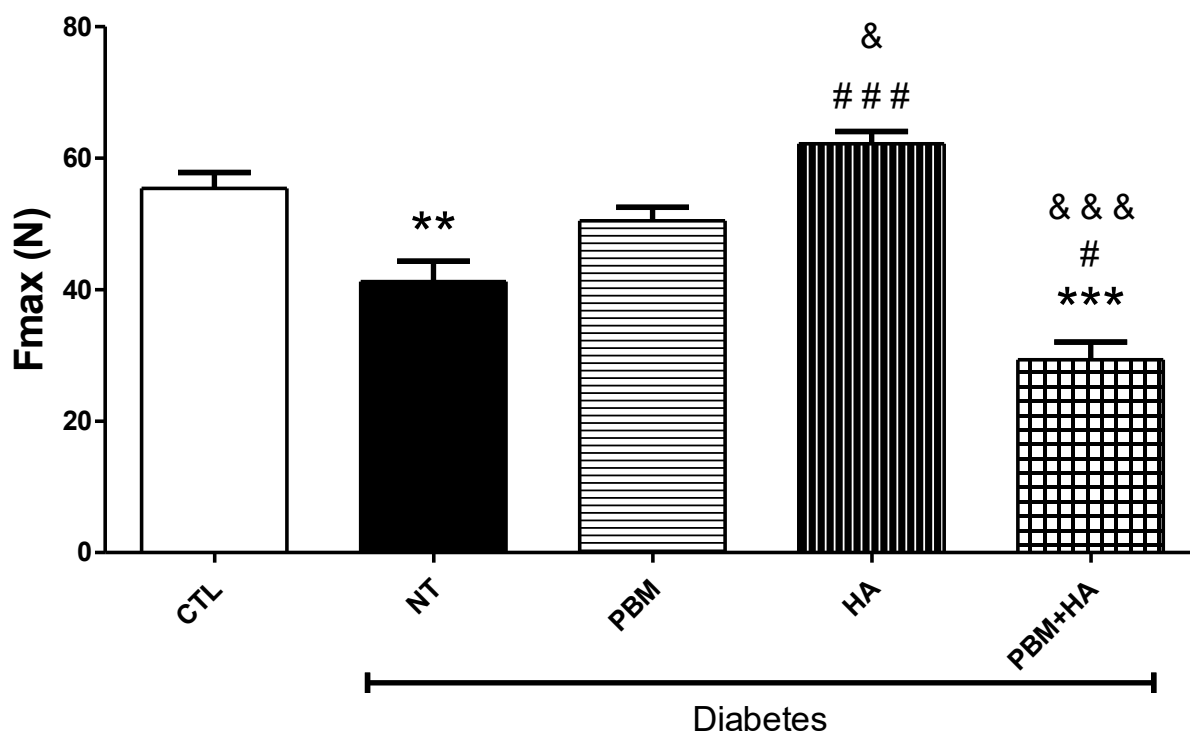


Figura 5- Propriedade mecânica da pele de animais com diabetes induzida. Força máxima de ruptura (Fmax). Grupos experimentais: Saudável Controle (CTL) e diabéticos sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação (PBM); Ácido Hialurônico injetável (HA) e ambas as terapias associadas (PBM+HA). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ Vs NT. & $p < 0,05$ e &&& $p < 0,001$ Vs PBM.

5.2- Quantificação da Deformação Máxima no momento da ruptura (Dmax)

Na figura 6, observa-se a redução de Dmax nos grupos com diabetes induzida sem tratamento (NT), bem como nos grupos tratados com ácido hialurônico (HA) e no grupo com tratamento associado (PBM+HA). O grupo PBM apresentou Dmax similar ao grupo saudável (CTL).

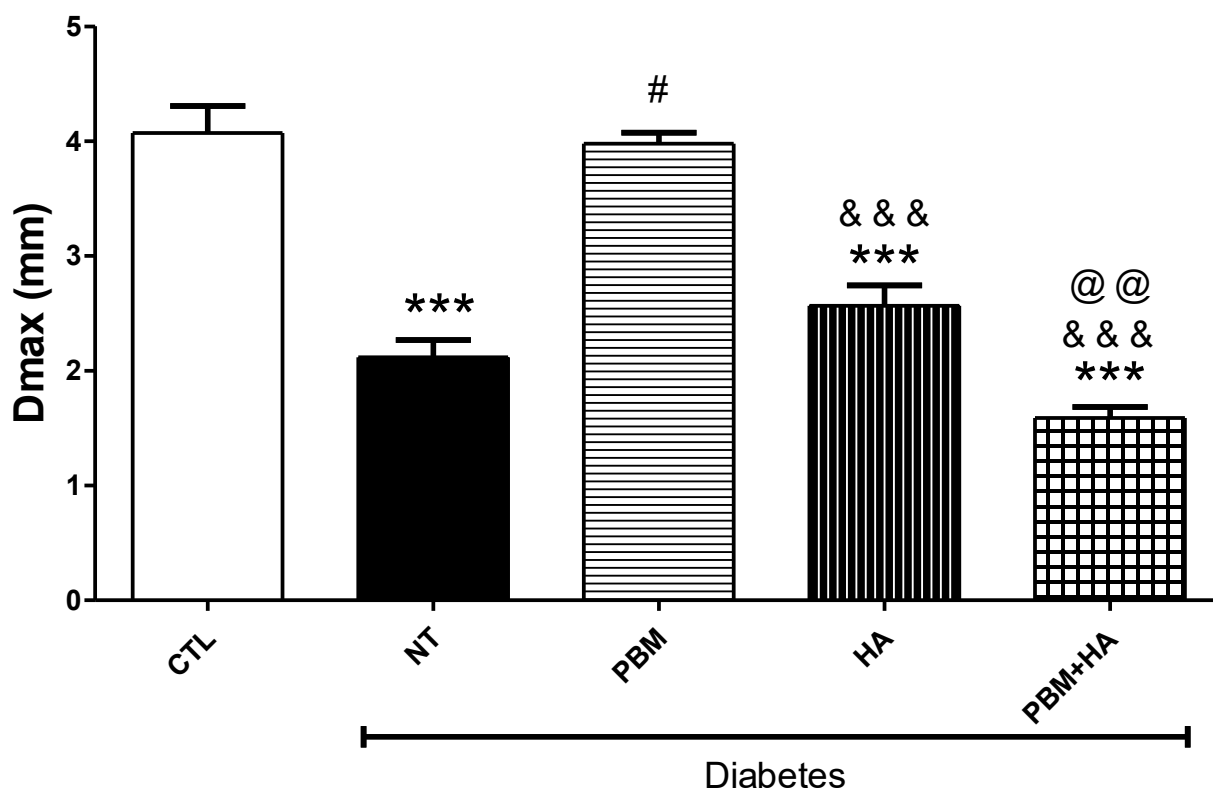


Figura 6- Propriedade mecânica da pele de animais com diabetes induzida. Deformação máxima (Dmax). Grupos experimentais: Saudável Controle (CTL) e diabéticos sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação (PBM); Ácido Hialurônico injetável (HA) e ambas as terapias associadas (PBM+HA). *** $p < 0,001$ Vs CTL. # $p < 0,05$ Vs NT. &&& $p < 0,001$ Vs PBM. @@ $p < 0,05$ Vs HA.

5.3- Relação entre as propriedades mecânicas da pele (Fmax X Dmax).

A figura 7 mostra a relação entre a força e a deformação máxima, no momento da ruptura da pele, durante ensaio cíclico de tração. Observa-se que o grupo NT diabético comparado ao grupo CTL saudável. O grupo tratado PBM mostrou resultados de Fmax e Dmax similares ao grupo CTL.

O grupo HA apresentou aumento de Fmax com redução de Dmax, enquanto o grupo com terapias associadas (PBM+HA) apresentou redução de ambas as propriedades mecânicas, quando comparado com todos os demais grupos experimentais.

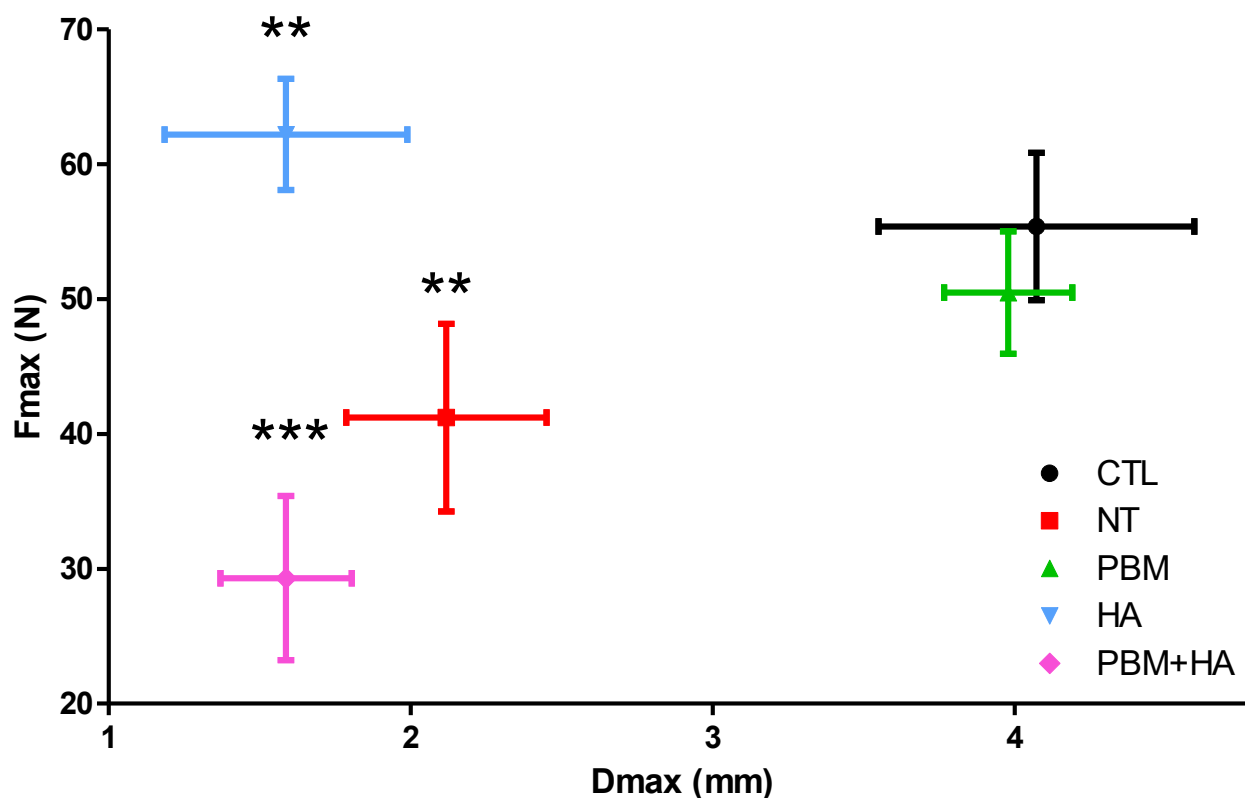


Figura 7: gráfico da relação entre Fmax e Dmax. Grupos experimentais: Saudável Controle (CTL) e diabéticos sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação (PBM); Ácido Hialurônico injetável (HA) e ambas as terapias associadas (PBM+HA). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL.

5.4- Imagens histológicas de lâminas coradas com *Picrosirius*. Quantificação de colágeno.

Na figura 8, observa imagens histológicas representativas dos 5 grupos experimentais. A quantificação do colágeno foi apresentada na figura 8F. O gráfico mostra a redução de colágeno em todos os grupos com Diabetes induzida, quando comparado ao grupo controle saudável (CTL). O grupo com terapias associadas (PBM+HA) apresentou maior diferença na redução de colágeno quando comparado ao grupo CTL.

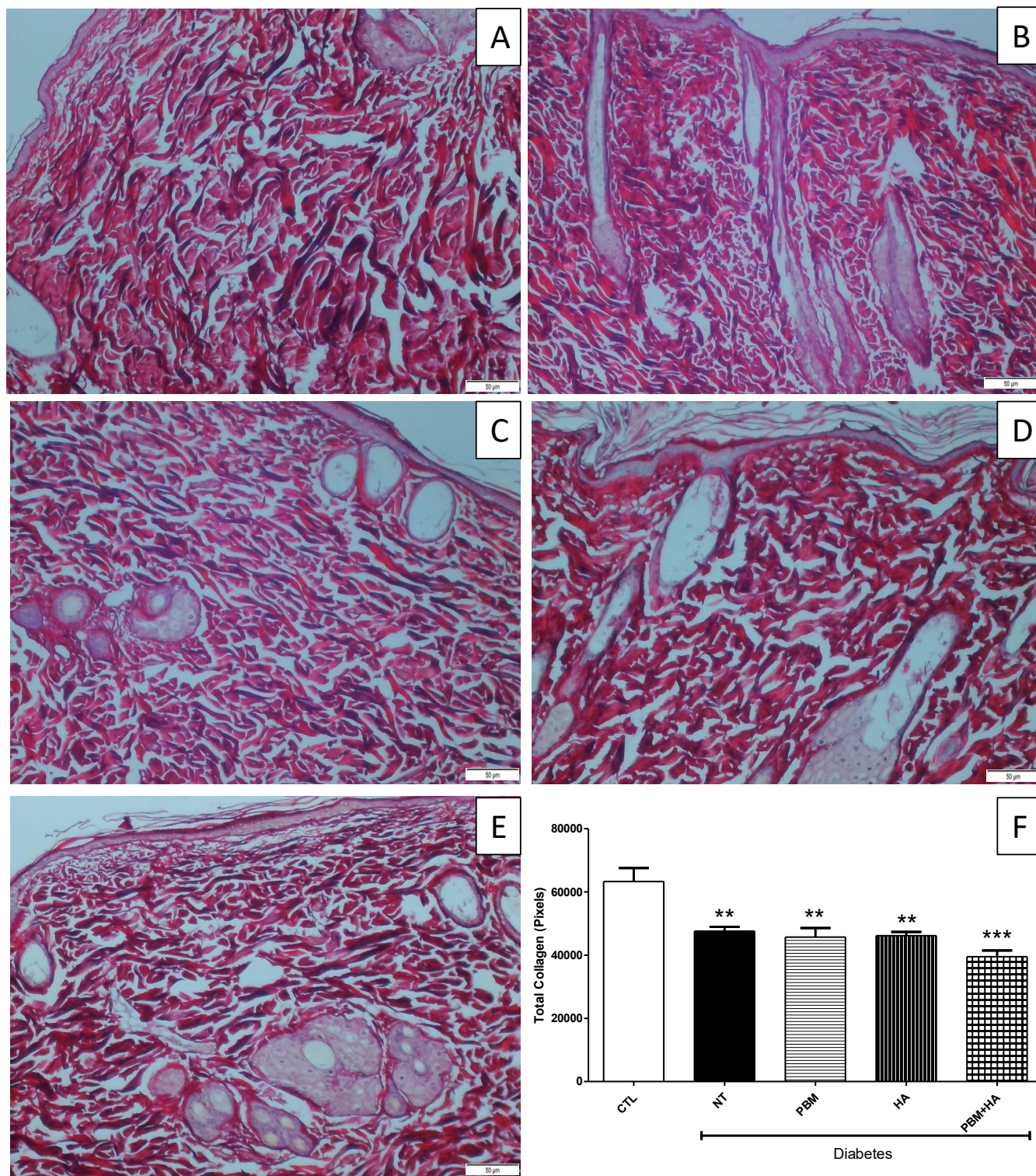


Figura 8- Imagens histológicas da pele de ratos. Corte Transversal. Aumento de 100X. Coloração: *Picrosirius* na cor Rosa, indicando Colágeno. Em (A): Grupo saudável Controle (CTL). Em (B) diabéticos sem tratamento (NT). Em (C) tratados com Fotobiomodulação (PBM). Em (D) tratados com Ácido Hialurônico injetável (HA). Em (E) tratados com terapias associadas (PBM+HA). Em (F) Quantificação de Colágeno. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL.

5.5- Quantificação de Colágeno tipo I e III

A figura 9 apresenta a quantificação do colágeno tipo I e III em lâminas coradas com *Picrosirius* e fotografadas em filtro com luz polarizada. No gráfico se observa a maior proporção de colágeno tipo I quando comparado ao colágeno tipo III em todos os grupos experimentais. Os grupos NT e HA apresentaram maior proporção de colágeno tipo I bem como menor proporção de colágeno tipo III, quando comparados ao grupo CTL. Os grupos PBM e PBM+HA apresentaram proporção entre Colágeno tipo I e III similar ao grupo CTL.

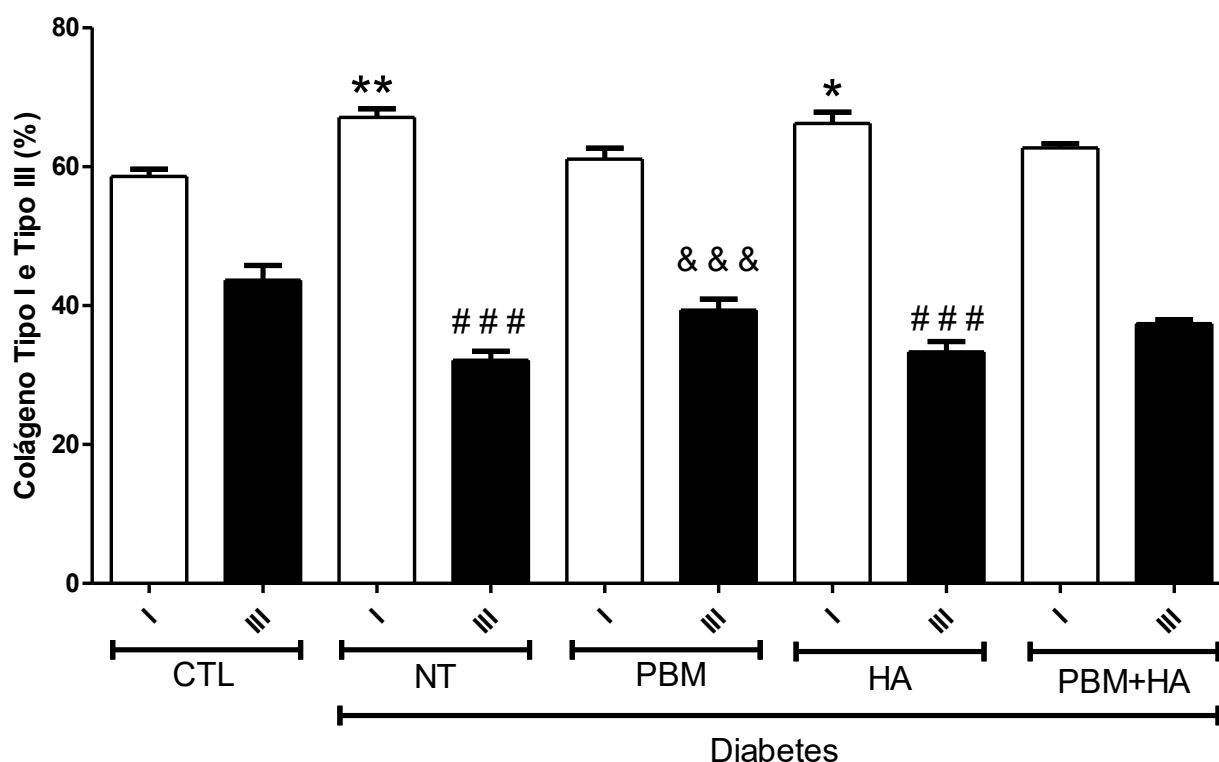


Figura 9- Proporção de Colágeno Tipo I e III a partir de imagens histológicas coradas com *Picrosirius* em luz polarizada. Grupos experimentais: Saudável Controle (CTL) e diabéticos sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação (PBM); Ácido Hialurônico injetável (HA) e ambas as terapias associadas (PBM+HA). * $p < 0,05$ e ** Vs CTL – Colágeno I. ### $p < 0,001$ Vs CTL – Colágeno III. & $p < 0,05$ e &&& $p < 0,001$ Vs NT – Colágeno III.

5.6- Imagens histológicas de lâminas coradas com *Picrosirius* e fotografadas com Luz Polarizada para quantificação de colágeno tipo I e III.

A figura 10 mostra imagens histológicas de pele de ratos com ou sem diabetes induzida, em diferentes grupos experimentais, sendo: Grupo saudável controle (A) – CTL ou grupo com animais diabéticos, sem tratamento (B) – NT ou tratados com Fotobiomodulação (C) – PBM, com ácido hialurônico (D) – HA e por fim, com associação entre ambas as terapias (E) – PBM+HA. Nas imagens histológicas obtidas por filtro de polarização da luz, a cor rosa foi considerada como colágeno tipo I e a cor verde como colágeno tipo III. A imagem (F) apresenta a relação entre Colágeno Tipo I e III.

No gráfico apresentado em 10F, é observado proporção de colágeno tipo I e III similar entre os grupos CTL e PBM. Os grupos HA e NT apresentação aumento na proporção de colágeno tipo I quando comparado ao grupo CTL.

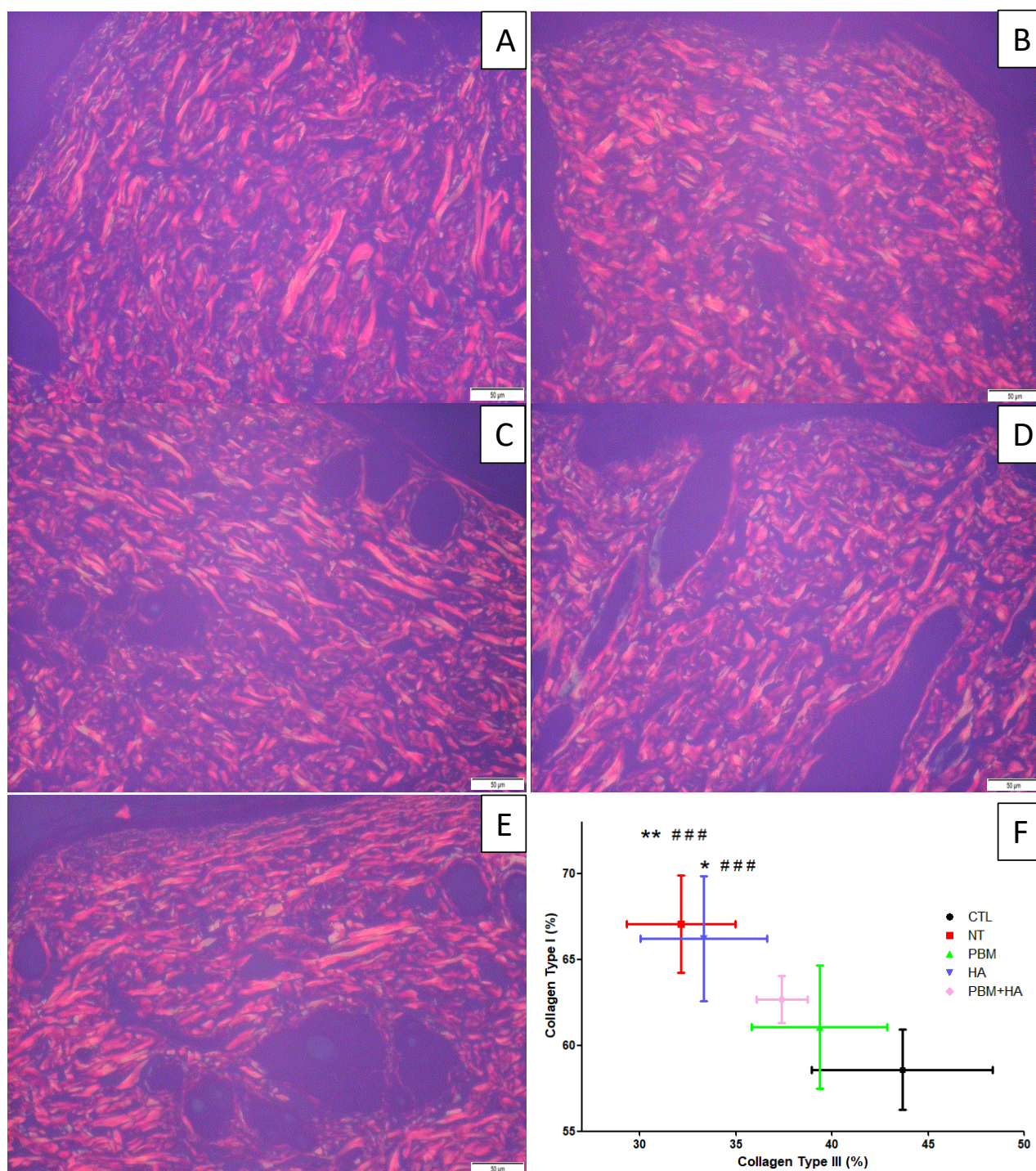


Figura 10- Imagens histológicas da pele de ratos. Corte Transversal. Aumento de 100X. Coloração: *Picrosirius* com Luz Polarizada. Em (A): Grupo saudável Controle (CTL). Em (B) diabéticos sem tratamento (NT). Em (C) tratados com Fotobiomodulação (PBM). Em (D) tratados com Ácido Hialurônico injetável (HA). Em (E) tratados com terapias associadas (PBM+HA). Em (F) gráfico da relação entre Colágeno Tipo I e Tipo III. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL – Colágeno I e ### $p < 0,001$ Vs CTL – Colágeno III .

6- DISCUSSÃO

Neste trabalho, discutiremos o papel da Terapia por Fotobiomodulação (PBM) associada com o uso de Ácido Hialurônico na resistência mecânica da pele, em modelo experimental de diabetes em ratos. Para isso, utilizamos 7 diferentes grupos experimentais, entre eles, o grupo com animais saudáveis (CTL) ou diabéticos, distribuídos em animais sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Ácido Hialurônico (HA), ou com a associação entre as terapias (PBM+HA). O Tratamento foi finalizado após 30 dias e a pele dos ratos foram recuperadas e utilizadas para avaliação da proporção de colágeno, a partir de lâminas histológicas coradas com *Picrosirius*. Foram também realizados testes biomecânicos nas peles dos diferentes grupos, para avaliação das propriedades mecânicas destes tecidos.

Observamos que a pele dos animais do grupo (NT) reduziu a resistência mecânica (Fmax), bem como a capacidade de deformação (Fmax), além de diminuir a proporção de colágeno total, com o respectivo aumento na proporção de colágeno tipo I comparado ao tipo III. As peles dos animais do grupo (HA) também reduziram a capacidade de deformação, contudo, foi observado aumento em Fmax, enquanto que a proporção de colágeno foi similar ao grupo NT também pelo aumento na proporção de colágeno tipo I comparado ao tipo III. O grupo (PBM) manteve a proporção de colágeno tipo I e III semelhante ao grupo CTL e também foi observada a manutenção da resistência mecânica da pele similar ao grupo saudável. Não foi observado efeito sinérgico na pele dos grupos diabéticos e com terapia associadas (PBM+HA), ao contrário, houve redução tanto na proporção de colágeno total como na resistência mecânica da pele.

Neste estudo, escolhemos o modelo de diabetes induzida em ratos, a fim de avaliar as conhecidas alterações na saúde da pele. A diabetes mellitus é uma condição sistêmica que afeta significativamente a integridade estrutural da pele, especialmente por meio da glicação avançada das fibras de colágeno. Estudos demonstram que a hiperglicemia crônica promove alterações na homeostase da matriz extracelular, levando à diminuição da síntese de colágeno tipo I e ao acúmulo de colágeno tipo III desorganizado, o que reduz a resistência mecânica e a elasticidade da pele (68,69). Existe também uma relação importante entre a rigidez da pele com a menor capacidade regenerativa em tecidos diabéticos (69), relacionados com baixos níveis de HbA1c, influenciando na densidade do colágeno. Além disso, também pode ocorrer redução na expressão de TGF- β 1 e aumento de MMP-9 em peles diabéticas, contribuindo para a desorganização da matriz extracelular

(70).

A escolha do modelo experimental em ratos Wistar com indução diabética por estreptozotocina se baseia em sua alta reprodutibilidade e capacidade de simular as alterações dérmicas presentes em pacientes diabéticos. Estudos recentes destacam a validade desse modelo para pesquisa com regeneração tecidual, permitindo análises de processos inflamatórios crônicos (69,70,73). Modelos de diabetes também já foram utilizados para estudar o processo de cicatrização, avaliando migração de fibroblastos dérmicos, queratinócitos, assim como a síntese de colágeno, comparando com animais normoglicêmicos (71,74), permitindo avaliações biomecânicas da pele, fornecendo dados quantitativos sobre elasticidade e rigidez (72,73,74,75).

Uma das estratégias terapêuticas utilizadas neste trabalho foi o tratamento dérmico com ácido hialurônico (HA). O HA é amplamente utilizado na prática clínica dermatológica por suas propriedades viscoelásticas e sua capacidade de estimular fibroblastos. A escolha do HA também foi fundamentada em evidências que demonstram seu papel na hidratação dérmica profunda e na ativação indireta da neocolagênese (76). O HA influencia a expressão de colágeno tipo I (77), melhorando o processo de remodelação tecidual por modular a expressão de MMPs, promovendo a integridade da junção dermoepidérmica (78,79).

Outra estratégia utilizada foi o uso da terapia por fotobiomodulação, selecionada por sua ação anti-inflamatória e reparadora, observada em diversos tecidos biológicos, tanto em trabalhos experimentais como em clínicos. O uso de laser vermelho já foi utilizado em outros estudos, com efeitos positivos no reparo dérmico (80). Outros estudos demonstraram que a PBM quando utilizada em parâmetros corretos podem estimular a síntese de colágeno, a partir da ativação de vias como a PI3K/Akt e MAPK, essenciais para a remodelação da matriz dérmica (81). Estudos clínicos também endossam o uso de PBM na melhora tecidual em pacientes com feridas crônicas (82). Pesquisas recentes também observaram que o uso de laser em comprimentos de onda na faixa do vermelho promovem resposta mitocondrial e expressão de genes reparadores em peles com metabolismo alterado (80,81).

Com relação às análises utilizadas neste trabalho, os testes biomecânicos são avaliações funcionais importantes, fornecendo informações relacionadas a resistência de tecidos biológicos. A escolha destas análises fundamenta-se na forte correlação entre integridade do colágeno e resistência biomecânica da pele. Estudos recentes sugerem que a redução do módulo de elasticidade pode estar diretamente relacionada com

alterações nas fibras colagênicas (82,83). Em peles diabéticas, essa abordagem é especialmente relevante, pois pode correlacionar rigidez aumentada com disfunção na síntese de colágeno (84). A literatura carece de estudos mais precisos que combinem análise mecânica com dados histológicos relacionados à proporção de colágeno, em modelos experimentais de diabetes tratados com Fotobiomodulação e Ácido Hialurônico. Associado a isso, os efeitos tanto da doença como dos tratamentos sobre as alterações da pele em animais após 8 semanas da indução da diabetes também reforçando a originalidade do presente trabalho.

Em nosso trabalho, o grupo NT (não tratado) apresentou alterações histológicas significativas em comparação ao grupo controle, com redução na proporção de colágeno tipo I além de piora nas propriedades mecânicas da pele (85,86,87). Estudos similares relatam que em modelos experimentais de diabetes, a ausência de tratamento favorece o acúmulo de colágeno glicado, o que reduz a plasticidade da pele (88). Estas alterações no colágeno podem estar relacionadas com o aumento da expressão de MMP-9 e uma queda na atividade de TIMP-1, promovendo maior degradação do colágeno e desorganização tecidual (89).

A presença do grupo NT justifica-se pela necessidade de evidenciar as alterações dérmicas exclusivamente atribuíveis ao diabetes, sem interferência de tratamentos externos. Estas alterações dérmicas estão relacionadas com desorganização progressiva da matriz extracelular, redução da síntese de colágeno e aumento da inflamação crônica (87). Além disso, a pele na diabetes apresenta um desequilíbrio redox o que estimula a apoptose de fibroblastos, prejudicando os mecanismos de reparo tecidual (90,91).

O grupo tratado com HA apresentou melhora da resistência mecânica (F_{max}), porém, com redução da capacidade de deformação da pele, evidenciada pela redução nos valores de D_{max} semelhantes ao grupo NT. O grupo HA também reduziu a proporção de colágeno total e manteve colágeno tipo I maior que o colágeno do tipo III. Estudos anteriores mostraram que o HA aumenta a expressão de colágeno tipo I e promove reestruturação da matriz dérmica em peles com baixa densidade colagênica (90). O HA também exerce efeito antioxidante e mitogênico sobre fibroblastos (92). Esses achados se alinham aos dados obtidos neste estudo, indicando que o HA possui papel relevante como monoterapia na resistência da pele, contudo, a redução da capacidade de deformação no grupo HA pode facilitar a ruptura, como observado neste estudo.

Trabalhos demonstrando o efeito da terapia com HA ainda são conflitantes. Enquanto estudos sugerem melhora na resistência e elasticidade da pele com o uso de

HA (92), outros demonstram que o uso deste produto, em altas concentrações ou em formulações inadequadas pode provocar reações inflamatórias locais (93). Também existem relatos da ausência de efeitos prolongados no uso do HA, sugerindo que seus efeitos podem ser otimizados dependendo da padronização de sua formulação e da técnica de aplicação do Ácido Hialurônico (94, 95,96).

Com relação aos efeitos da PBM na qualidade da pele, foi observada neste trabalho, a melhora tanto na proporção de colágeno tipo I e III, como nas propriedades mecânicas, a partir da manutenção tanto da resistência mecânica como da capacidade de deformação da pele, similares aos animais do grupo saudável (CTL). A PBM já foi utilizada em estudos experimentais de diabetes, onde se observou melhora da integridade dérmica, confirmando o seu potencial terapêutico na modulação do reparo da pele (97).

A manutenção na proporção de colágeno no grupo PBM, observada neste trabalho, estão de acordo com estudos de Wang *et al.* (98), que observaram aumento de 38% na deposição de colágeno em modelos diabéticos após aplicação de laser de baixa intensidade de potência. Além disso, estudos de Leyane, T. S. *et al.* (99) e Jere, S. W. *et al.* (100) confirmam que a PBM promove reorganização da matriz extracelular por meio da ativação de TGF- β 1 e inibição de MMP-9, contribuindo para a restauração da arquitetura dérmica. Estudos de Raja, I. (101) também demonstraram que a PBM proporcionou aumento da densidade de colágeno, sugerindo a melhora na resistência da pele, em modelo experimental de diabetes.

Em contraste, estudos experimentais de Pourhashemi, E. *et al.* 2023(102) não observaram efeitos significativos na qualidade da pele, no uso da PBM em modelos com alteração metabólica, sugerindo que fatores como profundidade de penetração e dosimetria podem influenciar nos efeitos da PBM. Essa diversidade de achados reforça a importância do controle rigoroso dos parâmetros utilizados, uma vez que a efetividade da PBM está diretamente relacionada com a adequação de diversos parâmetros, como comprimento de onda, tempo de exposição, fluência, além da condição clínica do paciente (Oyebode, O *et al.* 2021(103).

Ao analisar os resultados da associação da fotobiomodulação com o ácido hialurônico (PBM+HA), observamos que, apesar de manter a proporção de colágeno similar ao grupo NT, não apresentou melhora na resistência mecânica, com redução da capacidade de deformação, quando comparado aos grupos com terapia isolada (HA ou PBM). Estudos recentes sugerem que a PBM poderia potencializar a ação de moléculas bioativas em uso tópico, estimulada por mecanismos de Drug Delivery Target, agindo na

permeabilidade cutânea, aumentando sua eficácia intracelular (Zaccaron RP *et al.* 2022(104) e Bayat M. *et al.* 2024(105) Hwang *et al.* 2018(105). Também foi demonstrado que a PBM aumenta a deposição de colágeno, com melhora funcional, em modelos de alterações metabólicas (Vatandoust, D. *et al.* 2024(106).

Embora o HA apresente efeitos positivos na regeneração dérmica, suas limitações incluem a necessidade de aplicações repetidas para manutenção dos efeitos, além da variabilidade de resposta dependendo da reticulação do produto. Estudos como o de Zheng, H *et al.* 2024(107) destacam a rápida degradação do HA livre em tecidos com estresse oxidativo elevado. Outro ponto relevante é o risco de reações imunológicas leves, como edema ou eritema transitório, descritos por Zamboni F. *et al.* 2021(108) em modelos experimentais. Ainda, o custo de formulações de HA de alta qualidade pode ser um fator limitante para seu uso clínico.

A principal limitação no uso da PBM ainda reside na grande variabilidade dos parâmetros utilizados entre estudos, dificultando a padronização e comparação dos resultados. Revisões como a de Freitas e colaboradores (109) apontam que as fluências, comprimento de onda, tempo de exposição e frequência de aplicação variam amplamente, o que compromete a reprodutibilidade. Outro fator limitante é a profundidade de penetração, que pode ser insuficiente em tecidos mais espessos ou fibróticos. Além disso, a resposta individual à PBM depende do estado mitocondrial basal e pode apresentar variação interindividual significativa (Tanaka *et al.* 2023(110).

Com base nos resultados observados, a PBM surge como uma estratégia promissora para aplicação clínica em tecidos com metabolismo comprometido, como ocorre no diabetes. A adaptação individualizada dos parâmetros (fluência, frequência e tempo de exposição) poderá permitir protocolos personalizados com maior taxa de resposta.

7- CONCLUSÃO:

Conclui-se que o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, após 8 semanas, altera a proporção de colágeno, refletindo na redução da resistência da pele.

O tratamento com ácido hialurônico (2% em veículo líquido de carboximetilcelulosa hidratada, aplicação subcutânea), modificou a proporção de colágeno tipo I e III, apresentando tecido mais rígido que os demais grupos.

A PBM (660nm; 3J; 100mW) aplicada 3 vezes por semana, após 8 semanas da indução da diabetes, manteve tanto a proporção de colágeno como a resistência da pele, similar ao grupo saudável.

A terapia associada (PBM+HA) diminuiu a proporção de colágeno, reduzindo a resistência da pele, no modelo experimental de diabetes induzida.

8- REFERÊNCIAS

1. IDF IDF. IDF DIABETES ATLAS 9TH EDITION. 2019.
2. Oliveira JEPd, Montenegro Junior, Renan Magalhães *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.
3. DIABETES SBD. ABORDAGEM DA PESSOA IDOSA COM DIABETES - SBD 2019.
4. Brasil Caderno de Atenção Básica _ Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica _ diabetes mellitus. 2013;36:160p.
5. Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules*, 12(4), 542. <https://doi.org/10.3390/biom12040542>
6. Baldassarro, V. A., Lorenzini, L., Giuliani, A., Cescatti, M., Alastra, G., Pannella, M., Imbimbo, B. P., Villetti, G., Calzà, L., & Giardino, L. (2022). Molecular mechanisms of skin wound healing in non-diabetic and diabetic mice in excision and pressure experimental wounds. *Cell and tissue research*, 388(3), 595–613. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03624-x>
7. Wan, R., Weissman, J. P., Grundman, K., Lang, L., Grybowski, D. J., & Galiano, R. D. (2021). Diabetic wound healing: The impact of diabetes on myofibroblast activity and its potential therapeutic treatments. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 29(4), 573–581. <https://doi.org/10.1111/wrr.12954>
8. Kommoju, U.J., Reddy, B.M. Genetic etiology of type 2 diabetes mellitus: a review. *Int J Diabetes Dev Ctries* **31**, 51–64 (2011). <https://doi.org/10.1007/s13410-011-0020-8>
9. Kerner, W., Brückel, J., & German Diabetes Association (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 122(7), 384–386. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>
10. VINAY K AA, FAUSTO N, ASTER JC. <ROBBINS-COTRAN-patologia-bases-patológicas-das-doenças-8ed.pdf>.
11. American Diabetes Association (2020). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. *Diabetes care*, 43(Suppl 1), S14–

S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>

12. Vieira, W. F., de Magalhães, S. F., Farias, F. H., de Thomaz, A. A., & Parada, C. A. (2019). Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy. *Journal of biophotonics*, 12(11), e201900135. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900135>
13. Spichler, E. R., Spichler, D., Lessa, I., Costa e Forti, A., Franco, L. J., & LaPorte, R. E. (2001). Capture-recapture method to estimate lower extremity amputation rates in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 10(5), 334–340. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892001001100007>
14. MEDEIROS SOARES CELANI, LIVIA. Effect of hyaluronic acid on skin healing in diabetic rats. **JOURNAL OF SURGICAL AND CLINICAL RESEARCH**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 76–87, 2019. DOI: 10.20398/jscr.v10i2.18825.
15. Ahmed OM, Mohamed T, Moustafa H, Hamdy H, Ahmed RR, Aboud E. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:58-73.
16. Lim JZ, Ng NS, Thomas C. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *J R Soc Med*. 2017;110(3):104-109.
17. Boulton AJ. The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24 Suppl 1:S3-S6.
18. Boulton A. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabet Med*. 1996;13:12-16.
19. Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(1), 1–14.
20. AC G, JE H. <Guyton - Tratado de Fisiologia Médica.pdf>. 13 ed. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER; 2017. 3333 p.
21. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(3 Suppl):18S-28S.
22. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):94-101.
23. Patel, S., Srivastava, S., Singh, M. R., & Singh, D. (2019). Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound

healing. *Biomedicine & pharmacotherapy* = *Biomedecine & pharmacotherapie*, 112, 108615.

24. Goebeler R GaM. Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biolog.* 2001;69:513-521.

25. 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):876-880.

26. Meyer M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomedical engineering online*, 18(1), 24.

27. Medrado, A. P., Soares, A. P., Santos, E. T., Reis, S. R., & Andrade, Z. A. (2008). Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 92(3), 144–152.

28. Kjaer, M., Langberg, H., Heinemeier, K., Bayer, M. L., Hansen, M., Holm, L., Doessing, S., Kongsgaard, M., Krogsgaard, M. R., & Magnusson, S. P. (2009). From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 19(4), 500–510.

29. Panwar, P., Lamour, G., Mackenzie, N. C., Yang, H., Ko, F., Li, H., & Brömme, D. (2015). Changes in Structural-Mechanical Properties and Degradability of Collagen during Aging-associated Modifications. *The Journal of biological chemistry*, 290(38), 23291–23306.

30. Lee, H. W., Xu, Y., He, L., Choi, W., Gonzalez, D., Jin, S. W., & Simons, M. (2021). Role of Venous Endothelial Cells in Developmental and Pathologic Angiogenesis. *Circulation*, 144(16), 1308–1322.

31. Lee, H. W., Shin, J. H., & Simons, M. (2022). Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. *Experimental & molecular medicine*, 54(6), 711–719.

32. Vieira, Chrystiany & Furtado, Alessandra & Almeida, Priscilla & Luz, Maria & Pereira, Antônio. (2017). PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS EM IDOSOS ASSISTIDOS NA ATENÇÃO BÁSICA. *Revista Baiana de Enfermagem*. 31. 10.18471/rbe.v31i3.17397.

33. Brasil MdS, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. <Caderno de Atenção Básica _ Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica _ diabetes mellitus.pdf>. *Caderno de Atenção Básica _ Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica* Brasília- Brasil: Editora MS; 2013. p. 160p.

34. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Care in Diabetes—2025. *Diabetes Care*, 2025, vol. 48, no Supplement_1, p. S181-S206.

35. Dahmardehei M, Kazemikhoo N, Vaghardoost R, Mokmeli S, Momeni M, Nilfroushzadeh MA, *et al.* 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.
36. Ayuk, S. M., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2012). Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660 nm. *Diabetes technology & therapeutics*, 14(12), 1110–1117.
37. 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;29:272-285.
38. 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):113-118.
39. Endre Mester AFM, and Adam Mester. The Biomedical Effects of Laser Application Lasers in Surgery and Medicine 1985;5:31-39
40. 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;12:528-537.
41. 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;20:426-432.
42. Aparecida Da Silva A, 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):210-216.
43. 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. 257-265.
44. 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):307-313.
45. Carvalho, P. T., Mazzer, N., dos Reis, F. A., Belchior, A. C., & Silva, I. S. (2006). Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in

diabetic and non-diabetic rats. *Acta cirurgica brasileira*, 21(3), 177–183.

46. Carvalho, P.deT., Silva, I. S., Reis, F. A., Perreira, D. M., & Aydos, R. D. (2010). Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta cirurgica brasileira*, 25(1), 71–79.
47. 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):71-78.
48. 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):1305-1313.
49. 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):709-715.
50.
de Loura Santana, C., Silva, D.deF., Deana, A. M., Prates, R. A., Souza, A. P., Gomes, M. T., de Azevedo Sampaio, B. P., Shibuya, J. F., Bussadori, S. K., Mesquita-Ferrari, R. A., Fernandes, K. P., & França, C. M. (2015). Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PloS one*, 10(4), e0122042
51. 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):313-319.
52. Gal P, Stausholm MB, Kovac I, Dosedla E, Luczy J, Sabol F, *et al.* Should open excisions and sutured incisions be treated differently? A review and meta-analysis of animal wound models following low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2018;33(6):1351-1362.
53. Merigo EV, Paolo; Margalit, Meirav; Ricotti, Enrico; Stea, Stefano; Meleti, Marco; Manfredi, Madalena; Fornaini, Carlo. Efficacy of LLLT in swelling and pain control after the extraction of lower impacted third molars. *LASER THERAPY.* 2015;24:39-46.
54. de Lima FJ, de Oliveira Neto OB, Barbosa FT, do Nascimento Galvao AM, Ramos FW, de Lima CC, *et al.* Is there a protocol in experimental skin wounds in rats using low-level diode laser therapy (LLDLT) combining or not red and infrared wavelengths?

Systematic review. *Lasers Med Sci.* 2016;31(4):779-787.

55. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg.* 2004 Apr;22(2):141-150.

56. Dancakova L, Vasilenko T, Kovac I, Jakubcova K, Holly M, Revajova V, *et al.* Low-level laser therapy with 810 nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(4):198-204.

57. Nyman E, Henricson J, Ghafouri B, Anderson CD, Kratz G. Hyaluronic Acid Accelerates Re-epithelialization and Alters Protein Expression in a Human Wound Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2019 May 1;7(5):e2221.

58. Kaul A, Short WD, Keswani SG, Wang X. Immunologic Roles of Hyaluronan in Dermal Wound Healing. *Biomolecules.* 2021 Aug 18;11(8):1234.

59. Lebedowska, A., Chmielewski, R & Barańska-Rybak, W. (2025). Assessment of the Curative Anti-Glycation Properties of a Novel Injectable Formulation Combining Dual-Weight Hyaluronic Acid (Low-and Mid/High-Molecular Weight) with Trehalose on Human Skin Ex Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4747.

60. Rocha IR, Ciena AP, Rosa AS, Martins DO, Chacur M. Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):495-501.

61. 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;23:492-496.

62. Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):903-910.

63. 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):344-351.

64. Dadpay M, Sharifian Z, Bayat M, Bayat M, Dabbagh A. Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats by biomechanical evaluation. *J Photochem Photobiol B.* 2012;111:1-8.

65 Okano J, Kojima H, Katagi M, Nakagawa T, Nakae Y, Terashima T, Kurakane T,

Kubota M, Maegawa H, Udagawa J. Hyperglycemia Induces Skin Barrier Dysfunctions with Impairment of Epidermal Integrity in Non-Wounded Skin of Type 1 Diabetic Mice. *PLoS One*. 2016 Nov 15;11(11):e0166215.

66 Galeano M, Polito F, Bitto A, Irrera N, Campo GM, Avenoso A, Calò M, Lo Cascio P, Minutoli L, Barone M, Squadrito F, Altavilla D. Systemic administration of high-molecular weight hyaluronan stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jul;1812(7):752-759.

67 Leite MN, Frade MAC. Efficacy of 0.2% hyaluronic acid in the healing of skin abrasions in rats. *Heliyon*. 2021 Jul 13;7(7):e07572.

68. Kellar RS, Diller RB, Tabor AJ, Dominguez DD, Audet RG, Bardsley TA, Talbert AJ, Cruz ND, Ingraldi AL, Ensley BD. Improved Wound Closure Rates and Mechanical Properties Resembling Native Skin in Murine Diabetic Wounds Treated with a Tropoelastin and Collagen Wound Healing Device. *J Diabetes Clin Res*. 2020;2(3):86-99.

69 . Cruz TB, Carvalho FA, Matafome PN, Soares RA, Santos NC, Travasso RD, Oliveira MJ. Mice with Type 2 Diabetes Present Significant Alterations in Their Tissue Biomechanical Properties and Histological Features. *Biomedicines*. 2022; 10(1):57.

70. Rai, V., Moellmer, R. & Agrawal, D.K. Clinically relevant experimental rodent models of diabetic foot ulcer. *Mol Cell Biochem* **477**, 1239–1247 (2022).

71. Zheng, W., Li, H., Go, Y., Chan, X. H., Huang, Q., & Wu, J. (2022). Research Advances on the Damage Mechanism of Skin Glycation and Related Inhibitors. *Nutrients*, 14(21), 4588.

72. Pal, D., Das, P., Mukherjee, P., Roy, S., Chaudhuri, S., Kesh, S. S., ... & Nandi, S. K. (2024). Biomaterials-based strategies to enhance angiogenesis in diabetic wound healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 10(5), 2725-2741.

73. Bento, G., Shafigullina, A. K., Rizvanov, A. A., Sardão, V. A., Macedo, M. P., & Oliveira, P. J. (2020). Urine-derived stem cells: applications in regenerative and predictive medicine. *Cells*, 9(3), 573.

74. Çıtak Demirez, S., Erkut, T. S., Çakmak, A. S., Gürpınar, Ö. A., & Gümüşderelioğlu, M. (2025). Therapeutic potential of near-infrared polychromatic light in hyperglycemic human cell models: Toward improved diabetic wound healing. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 270, 113224

75. Connizzo, B. K., Bhatt, P. R., Liechty, K. W., & Soslowsky, L. J. (2014). Diabetes

alters mechanical properties and collagen fiber re-alignment in multiple mouse tendons. *Annals of biomedical engineering*, 42, 1880-1888.

76. Chmielewski, R., Lebiedowska, A., & Barańska-Rybak, W. (2025). Assessment of the Curative Anti-Glycation Properties of a Novel Injectable Formulation Combining Dual-Weight Hyaluronic Acid (Low-and Mid/High-Molecular Weight) with Trehalose on Human Skin Ex Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4747.

77. Choi, S. H., Kim, H. C., Jang, S. G., Lee, Y. J., Heo, J. Y., Kweon, G. R., & Ryu, M. J. (2024). Effects of a combination of polynucleotide and hyaluronic acid for treating osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1714.

78. Shan, Y., Jin, Y., Zhang, X., Tang, Y., Lai, W., Liao, J., ... & Long, H. (2025). Development of a novel hyaluronic acid/alginate/RANKL degradable microneedle patch for accelerating bone remodeling and orthodontic tooth movement through promoting osteoclastogenesis. *International Journal of Pharmaceutics*, 669, 124915.

79. Duteil, L., Queille-Roussel, C., Issa, H., Sukmansaya, N., Murray, J., & Fanian, F. (2023). The Effects of a Non-crossed-linked Hyaluronic Acid Gel on the Aging Signs of the Face versus Normal Saline: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Split-faced Study. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 16(2), 29–36.

80. Kuhn-Dall'Magro, A., Zamboni, E., Fontana, T., Dogenski, L. C., De Carli, J. P., Dall'Magro, E., & Fornari, F. (2022). Low-level laser therapy in the management of oral mucositis induced by radiotherapy: a randomized double-blind clinical trial. *J Contemp Dent Pract*, 23(1), 31-36.

81. Kasowanjete, P., Abrahamse, H., & Houreld, N. N. (2023). Photobiomodulation at 660 nm stimulates in vitro diabetic wound healing via the Ras/MAPK pathway. *Cells*, 12(7), 1080.

82. Oyebode, O. A., Jere, S. W., & Houreld, N. N. (2023). Current Therapeutic Modalities for the Management of Chronic Diabetic Wounds of the Foot. *Journal of diabetes research*, 2023, 1359537.

83. Trajano, L. A. D. S. N., Siqueira, P. B., Rodrigues, M. M. D. S., Pires, B. R. B., da Fonseca, A. D. S., & Mencalha, A. L. (2025). Does photobiomodulation alter mitochondrial dynamics?. *Photochemistry and Photobiology*, 101(1), 21-37.

84. Mehrvar, S., Mostaghimi, S., Foomani, F. H., Abroe, B., Eells, J. T., Gopalakrishnan, S., & Ranji, M. (2021). 670 nm photobiomodulation improves the mitochondrial redox state of diabetic wounds. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 11(1), 107.

85. Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual review of food science and technology*, 6(1), 527-557.
86. Crossland, S. R., Sairally, F., Edwards, J., Culmer, P., & Brockett, C. L. (2024). Mechanical characteristics of diabetic and non-diabetic plantar skin. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 150, 106279.
87. LeSueur, J., Koser, J., Dzwierzynski, W., Stemper, B. D., Hampton, C. E., Kleinberger, M., & Pintar, F. A. (2025). The Histological and Mechanical Behavior of Skin During Puncture for Different Impactor Sizes and Loading Rates. *Annals of biomedical engineering*, 53(5), 1209–1225.
88. Cruz, T. B., Carvalho, F. A., Matafome, P. N., Soares, R. A., Santos, N. C., Travasso, R. D., & Oliveira, M. J. (2021). Mice with type 2 diabetes present significant alterations in their tissue biomechanical properties and histological features. *Biomedicines*, 10(1), 57.
89. Zhou, P., Yang, C., Zhang, S., Ke, Z. X., Chen, D. X., Li, Y. Q., & Li, Q. (2021). The imbalance of MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 contributes to collagen deposition disorder in diabetic non-injured skin. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 734485.
90. Huang, J., Heng, S., Zhang, W., Liu, Y., Xia, T., Ji, C., & Zhang, L. J. (2022, August). Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 128, pp. 137-144). Academic Press.
91. Kim, Y. S., Lee, H. Y., Jang, J. Y., Lee, H. R., Shin, Y. S., & Kim, C. H. (2021). Redox treatment ameliorates diabetes mellitus-induced skin flap necrosis via inhibiting apoptosis and promoting neoangiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 246(6), 718-728.
92. Corrêa, M. E. A. B., Mendes, C., Bittencourt, J. V. S., Takejima, A., de Souza, I. C., de Carvalho, S. C. D., ... & Silveira, P. C. L. (2022). Effects of the application of decellularized amniotic membrane solubilized with hyaluronic acid on wound healing. *Annals of biomedical engineering*, 50(12), 1895-1910.
93. Huang, M., Liu, C., Shao, Y., Zhou, S., Hu, G., Yin, S., ... & Yu, H. (2022). Anti-tumor pharmacology of natural products targeting mitosis. *Cancer Biology & Medicine*, 19(6), 774-801.
94. Chmielewski, R., & Lesiak, A. (2024). Mitigating Glycation and Oxidative Stress in Aesthetic Medicine: Hyaluronic Acid and Trehalose Synergy for Anti-AGEs Action in Skin

Aging Treatment. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2701-2712.

95. Han, W., Lv, Y., Sun, Y., Wang, Y., Zhao, Z., Shi, C., ... & Wang, X. (2022). The anti-inflammatory activity of specific-sized hyaluronic acid oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 276, 118699.
96. Shi, C., Zhang, Y., Wu, G., Zhu, Z., Zheng, H., Sun, X., ... & Liang, B. (2024). Hyaluronic acid-based reactive oxygen species-responsive multifunctional injectable hydrogel platform accelerating diabetic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 13(4), 2302626.
97. Reis, C. H. B., Buchaim, D. V., Ortiz, A. D. C., Fideles, S. O. M., Dias, J. A., Miglino, M. A., ... & Buchaim, R. L. (2022). Application of fibrin associated with photobiomodulation as a promising strategy to improve regeneration in tissue engineering: a systematic review. *Polymers*, 14(15), 3150.
98. Wang, K., Zhao, H., Zhao, X., Zhang, X., Zhang, W., Cheng, Y., & Ge, J. (2024). Photobiomodulation for diabetes and its complications: a review of general presentation, mechanisms and efficacy. *Annals of Medicine*, 56(1), 2433684.
99. Leyane, T. S. (2022). *Influence of Photobiomodulation in the Near-Infrared Range (830nm) on the JAK/STAT Signalling Pathway in Diabetic Wounded Fibroblast Cells*. Thesis for Master Degree. University of Johannesburg (South Africa).
100. Jere, S. W., & Houreld, N. N. (2024). Photobiomodulation (PBM): a therapeutic technique targeting fibroblast cell regeneration and survival in diabetic wounds. *Frontiers in photonics*, 5, 1423280.
101. Raja, I. S., Kim, C., Oh, N., Park, J. H., Hong, S. W., Kang, M. S., ... & Han, D. W. (2024). Tailoring photobiomodulation to enhance tissue regeneration. *Biomaterials*, 122623.
102. Asadi, R., Mostafavinia, A., Amini, A., Ahmadi, H., Ahrabi, B., Omid, H., ... & Bayat, M. (2023). Acceleration of a delayed healing wound repair model in diabetic rats by additive impacts of photobiomodulation plus conditioned medium of adipose-derived stem cells. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 22(2), 1551-1560.
103. Oyebo, O., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2021). Photobiomodulation in diabetic wound healing: a review of red and near-infrared wavelength applications. *Cell Biochemistry and Function*, 39(5), 596-612.
104. Zaccaron, R. P., Barbieri, R. T., Mendes, C., Venturini, L. M., Alves, N., Mariano, S. D. S., Lock Silveira, P. C. (2022). Photobiomodulation associated with lipid nanoparticles and hyaluronic acid accelerate the healing of excisional wounds. *Journal of Biomaterials*

Applications, 37(4), 668-682.

105. Hwang, M. H., Son, H. G., Lee, J. W., Yoo, C. M., Shin, J. H., Nam, H. G., ... & Choi, H. (2018). Photobiomodulation of extracellular matrix enzymes in human nucleus pulposus cells as a potential treatment for intervertebral disk degeneration. *Scientific reports*, 8(1), 11654.
106. Vatandoust, D., Ahmadi, H., Amini, A., Mostafavinia, A., Fathabady, F. F., Moradi, A., & Bayat, M. (2024). Photobiomodulation preconditioned diabetic adipose derived stem cells with additional photobiomodulation: an additive approach for enhanced wound healing in diabetic rats with a delayed healing wound. *Lasers in Medical Science*, 39(1), 86.
107. Shi, C., Zhang, Y., Wu, G., Zhu, Z., Zheng, H., Sun, X., ... & Liang, B. (2024). Hyaluronic acid-based reactive oxygen species-responsive multifunctional injectable hydrogel platform accelerating diabetic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 13(4), 2302626.
108. Zamboni, F. (2021). *Hyaluronic acid 3D microenvironments for diabetes treatment* (Doctoral dissertation, University of Limerick).
109. Cardoso Soares, P., de Freitas, P. M., Eduardo, C. D. P., & Azevedo, L. H. (2023). Photobiomodulation, Transmucosal Laser Irradiation of Blood, or B complex as alternatives to treat Covid-19 Related Long-Term Taste Impairment: double-blind randomized clinical trial. *Lasers in Medical Science*, 38(1), 261.
110. Bolliger, D., Tanaka, K. A., & Steiner, L. A. (2023). Patient blood management programmes: keeping the ball rolling. *British Journal of Anaesthesia*, 131(3), 426-428.

9-ANEXOS

9.1- Aprovação do Comitê de Ética Animal da UNINOVE. CEUA Nº 3295160919.



Universidade Nove de Julho
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v27/10/2021

Certificamos que a EMENDA (versão de 27/10/2021) da proposta intitulada "Estudo comparativo entre fotobiomodulação local e sistêmica em modelo experimental de lesão cutânea em animais diabéticos", CEUA nº 3295160919 (10 041111), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) em 08/12/2021.

Pedido apresentado à CEUA: 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 número de animais de acordo com o Formulário, ficando igual ao projeto (56 animais) e foi realizada correção da dose de anestésicos.

Considerações da CEUA: Emenda aprovada. Foi alterado o número de animais de 40 para 56 ratos machos.

Término previsto: 12/2022

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Especie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 6 meses

Quantidade
solicitada: 56

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 350 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos	96	0

São Paulo, 03 de dezembro de 2024

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

9.2- Análise estatística da figura 5 – Propriedades Mecânicas – Fmax (N)

1way ANOVA						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	CTL vs NT	14.17	5.729	Yes	**	3.702 to 24.64
24	CTL vs PBM	4.895	1.979	No	ns	-5.573 to 15.36
25	CTL vs HA	-6.823	2.759	No	ns	-17.29 to 3.644
26	CTL vs PBM+HA	26.08	10.54	Yes	***	15.61 to 36.55
27	NT vs PBM	-9.275	3.750	No	ns	-19.74 to 1.193
28	NT vs HA	-20.99	8.488	Yes	***	-31.46 to -10.53
29	NT vs PBM+HA	11.91	4.814	Yes	*	1.440 to 22.38
30	PBM vs HA	-11.72	4.738	Yes	*	-22.19 to -1.251
31	PBM vs PBM+HA	21.18	8.564	Yes	***	10.71 to 31.65
32	HA vs PBM+HA	32.90	13.30	Yes	***	22.43 to 43.37
33						

9.3- Análise estatística da figura 6 – Propriedades Mecânicas – Dmax (mm)

1way ANOVA						
13	P value	0.3684				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	24.87	4	6.216		
19	Residual (within columns)	2.545	20	0.1273		
20	Total	27.41	24			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	CTL vs NT	1.953	12.24	Yes	***	1.278 to 2.629
24	CTL vs PBM	0.09393	0.5888	No	ns	-0.5812 to 0.7691
25	CTL vs HA	1.506	9.443	Yes	***	0.8313 to 2.182
26	CTL vs PBM+HA	2.484	15.57	Yes	***	1.809 to 3.159
27	NT vs PBM	-1.860	11.66	Yes	***	-2.535 to -1.184
28	NT vs HA	-0.4470	2.802	No	ns	-1.122 to 0.2281
29	NT vs PBM+HA	0.5305	3.325	No	ns	-0.1446 to 1.206
30	PBM vs HA	1.413	8.854	Yes	***	0.7374 to 2.088
31	PBM vs PBM+HA	2.390	14.98	Yes	***	1.715 to 3.065
32	HA vs PBM+HA	0.9775	6.127	Yes	**	0.3024 to 1.653
33						

9.4- Análise estatística da figura 8 – Colágeno Total

1way ANOVA						
13	P value	0.0880				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	1566000000	4	391400000		
19	Residual (within columns)	675900000	20	33800000		
20	Total	2242000000	24			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	CTL vs NT	15690	6.035	Yes	**	4688 to 26690
24	CTL vs PBM	17580	6.761	Yes	***	6575 to 28580
25	CTL vs HA	17110	6.580	Yes	**	6105 to 28110
26	CTL vs PBM+HA	23760	9.139	Yes	***	12760 to 34760
27	NT vs PBM	1886	0.7256	No	ns	-9116 to 12890
28	NT vs HA	1417	0.5449	No	ns	-9586 to 12420
29	NT vs PBM+HA	8070	3.104	No	ns	-2933 to 19070
30	PBM vs HA	-469.8	0.1807	No	ns	-11470 to 10530
31	PBM vs PBM+HA	6183	2.378	No	ns	-4819 to 17190
32	HA vs PBM+HA	6653	2.559	No	ns	-4349 to 17660
33						
34						

9.5- **Análise estatística da figura 9 – Quantificação de Colágeno I e III por *Picrosirius*.**

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Coll Type I & III				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	10				
8	F	104.7				
9	R squared	0.9593				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	9.112				
13	P value	0.4270				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	9100	9	1011		
19	Residual (within columns)	386.3	40	9.657		
20	Total	9486	49			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	I vs III	14.94	10.75	Yes	***	8.357 to 21.52
24	I vs I	-8.472	6.096	Yes	**	-15.05 to -1.891
25		10.45	10.00	Yes	***	4.071 to 20.83
1way ANOVA						
37	III vs III	10.31	7.420	Yes	***	3.732 to 16.89
38	III vs I	-19.03	13.69	Yes	***	-25.61 to -12.45
39	III vs III	6.264	4.507	No	ns	-0.3165 to 12.84
40	I vs III	34.92	25.13	Yes	***	28.34 to 41.50
41	I vs I	6.005	4.321	No	ns	-0.5751 to 12.59
42	I vs III	27.72	19.94	Yes	***	21.14 to 34.30
43	I vs I	0.8474	0.6098	No	ns	-5.733 to 7.428
44	I vs III	33.72	24.26	Yes	***	27.14 to 40.30
45	I vs I	4.382	3.153	No	ns	-2.198 to 10.96
46	I vs III	29.67	21.35	Yes	***	23.09 to 36.25
47	III vs I	-28.92	20.81	Yes	***	-35.50 to -22.34
48	III vs III	-7.206	5.185	Yes	*	-13.79 to -0.6255
49	III vs I	-34.08	24.52	Yes	***	-40.66 to -27.49
50	III vs III	-1.201	0.8641	No	ns	-7.782 to 5.380
51	III vs I	-30.54	21.98	Yes	***	-37.12 to -23.96
52	III vs III	-5.250	3.777	No	ns	-11.83 to 1.331
53	I vs III	21.71	15.62	Yes	***	15.13 to 28.29
54	I vs I	-5.158	3.711	No	ns	-11.74 to 1.423
55	I vs III	27.72	19.94	Yes	***	21.14 to 34.30
56	I vs I	-1.623	1.168	No	ns	-8.204 to 4.957
57	I vs III	23.67	17.03	Yes	***	17.09 to 30.25
58	III vs I	-26.87	19.33	Yes	***	-33.45 to -20.29
59	III vs III	6.005	4.321	No	ns	-0.5754 to 12.59
60	III vs I	-23.33	16.79	Yes	***	-29.92 to -16.75