



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA



MARIA CAROLINA DERENCIO OLIVEIRA

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO LASER NO
PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DE ENXERTO DE PELE TOTAL,
EM RATOS**

São Carlos - SP

2023

MARIA CAROLINA DERENCIO OLIVEIRA

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO LASER NO
PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DE ENXERTO DE PELE TOTAL,
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Richard Eloin Liebano

Coorientadora: Dra. Patricia Brassolatti

São Carlos - SP

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio parcial da
**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Brasil (CAPES)**

Dedico esta tese a minha criança, que um dia ouviu do seu professor de matemática “comparado ao seu irmão, você tem o dom da beleza e ele da inteligência”.

A pequena que ainda mora dentro de mim aprendeu que persistência e fé a tornam capaz.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Neiton Nilceu Oliveira Junior** e **Maria de Lurdes Derencio Oliveira**, por me segurarem firme diante de tantas adversidades acadêmicas até o encerramento desta tese. Vocês estiveram presentes em cada etapa da minha trajetória, suprindo circunstâncias para além de suas responsabilidades. Tê-los em minha base me possibilitou chegar tão longe, obrigada por tanto! Em minhas orações, agradeço constantemente pelo privilégio de ser filha de vocês!

Ao meu irmão **Rafael Afonso Derencio Oliveira**, cruz da minha vida e meu melhor amigo. Tenho muito orgulho da nossa união, da nossa amizade sincera, sem polimentos sociais. Você foi a pessoa que me demonstrou o acolhimento, sendo aquele que sempre me escuta sem me julgar (aliás, se um dia você resolver abrir a boca, “tô ferrada! rsrs”). Muito obrigada por dividir a vida comigo até aqui, e por fornecer as “dorgas” farmacológicas que me auxiliaram chegar até esse momento. “Ter um irmão é ter, pra sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração” (Tati Bernardi).

Ao **Prof. Dr. Richard Eloin Liebano**, lembro-me de quando você chegou na UFSCar, em 2015, e na época eu era aluna de iniciação científica no laboratório. Participamos da confraternização no final do ano, e quando chegou a sua vez de revelar sua amiga secreta, você simplesmente indicou que ela tinha o nome de uma estrutura anatômica (linha alba, e sua amiga secreta se chamava Albaiza). Eu nunca esqueci esse momento sagaz, e nele percebi que você era um professor diferenciado. Anos depois, bati na sua porta e você me acolheu como sua aluna em nível de doutorado. Com os seus ensinamentos pude evoluir para além do acadêmico, aprendendo sobre rigor profissional, didática ímpar, confiança e respeito pelo tempo do próximo. Não posso negar que sua ausência foi muito sentida neste meu último ano de doutorado, mas também preciso enfatizar sua disposição e paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas e contribuir para o meu engrandecimento, além da amizade construída durante esse período de convivência. Obrigada pela oportunidade de tê-lo como orientador! A você, minha eterna gratidão, admiração e respeito.

À **Dra. Patricia Brassolatti**, minha eterna coorientadora. Foram três anos como sua aluna de iniciação científica e mais cinco de doutorado; foi um privilégio iniciar e encerrar meu ciclo acadêmico com a sua parceria. Sua ausência também foi

muito sentida neste meu último ano de doutorado, mas seu reconhecimento era algo inevitável e eu sempre estarei na torcida por você, assim como quando possível, repetindo essa parceria mais e mais vezes. Os aprendizados que adquiri com você transcenderam o ambiente laboratorial. Muito obrigada por tudo minha amiga!

*À **Profa. Dra. Mariana Árias Avila Vera**, que na prorrogação aceitou ser minha tutora no programa de pós-graduação. Desde as aulas de capacitação docente, em 2018, cultivo uma estima que só aumenta pela profissional e pessoa incrível que você é. Obrigada pelas trocas de conhecimentos, pelas conversas leves, pelo afeto e amizade!*

*À minha primeira aluna de iniciação científica **Lara Maria Bataglia Espósito**, que presente incrível foi coorientar você. Quando recebi a notícia de que você havia escolhido integrar o projeto de pesquisa deste doutorado, fiquei com medo de não ser suficiente para lhe ensinar tudo o que eu julgava necessário. Eis que construímos uma relação de igualdade, conquistamos duas iniciações científicas com bolsa (totalmente na contramão da realidade dos cortes orçamentários para a educação), e crescemos muito juntas! Saiba que você sempre poderá contar comigo, e que te desejo muito mais aprendizados e as melhores experiências em sua continuidade acadêmica.*

*Às professoras **Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte**, **Dra. Fernanda de Freitas Anibal**, às amigas **Camila Pereira Sabadini**, **Krissia Franco de Godoy** e **Lara Maria Bataglia Espósito**, e ao amigo **Luis Henrique Oliveira de Moares**, vocês foram fundamentais e decisivos para a conclusão deste doutorado. Quando me deparei sem os subsídios básicos para o desenvolvimento dos meus experimentos, fui amparada pelas professoras **Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte** e **Dra. Fernanda de Freitas Anibal**. Quando precisei de mãos para auxiliar as minhas e ouvidos para diversas dúvidas e desabafos neste último ano, tive a benção de tê-los ao meu lado: **Camila**, **Krissia**, **Lara** e **Luis**. Sempre que estiver ao meu alcance, passarei a diante o exemplo de sensibilidade e disposição para com o próximo, que cada um de vocês destinou a mim. Muito obrigada!*

*A todos e todas que passaram pelo **Laboratório de Pesquisas em Recursos Fisioterapêuticos (LAREF)**, dentre os anos de 2013 a 2015, correspondentes ao período de minha iniciação científica e quando as pesquisas experimentais eram totalidade, aos anos de 2018 a 2023 e reformulação para os estudos clínicos. Levo comigo crescimento acadêmico, profissional e pessoal de cada um que troquei*

vivências por todos esses anos. Por hora, eu apago a luz dos anos experimentais, com muito carinho, nostalgia e gratidão.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pela disponibilidade e altruísmo em contribuírem para o enriquecimento deste trabalho, para a minha formação e para a ciência brasileira.

“Agradecer também faz parte da oração!”

Ivo Mozart - Anjos de Plantão

***“Lembra de que todo mundo ganha
Respeitando a batalha de cada um
Toda pessoa que a gente encontra
Tem uma história
Por trás das histórias que nos conta
São sonhos interrompidos, são medos escondidos
São coragens em que seríamos surpreendidos
Pela força descoberta quando tudo parecia perdido”***

Allan Dias Castro - Voz ao Verbo: poemas para calar o medo

RESUMO

A técnica de enxertia cutânea é definida pela transferência de um segmento de pele para uma área corporal danificada, sem pedículo vascular. O processo de integração do enxerto é complexo, visto que é preciso restabelecer o suprimento sanguíneo e conseqüentemente muitas complicações são desencadeadas. Para evitar a reincidência, buscam-se tratamentos de baixo custo, fácil aplicabilidade e com ações locais que estimulem o processo cicatricial. Recentemente, a fotobiomodulação (FBM) laser começou a ser investigada nessa temática, devido aos seus efeitos trófico-regenerativos descritos na literatura para diversas feridas cutâneas. Porém, os estudos ainda são iniciais, com protocolos e dosimetria inconclusivos. À vista disso, o objetivo desta tese foi avaliar a relação entre potência e tempo de irradiação da FBM laser em fibroblastos, nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm), investigando-a posteriormente como proposta terapêutica para otimizar a integração de enxerto de pele total, quando aplicada na área receptora ou como tratamento pós-cirúrgico. No primeiro estudo e *in vitro*, células de fibroblastos de pele humana foram irradiadas com energia de 1 J na potência de 50 mW e tempo de 20 s ou na potência de 100 mW e tempo de 10 s, para cada comprimento de onda. Após a avaliação da proliferação celular e do mediador inflamatório interleucina-6 (IL-6), concluiu-se que a associação da maior potência com o menor tempo de irradiação foi mais eficaz para estimular os fibroblastos e reduzir a IL-6. Nos estudos *in vivo*, foram utilizados 60 ratos e todos foram submetidos a cirurgia de enxerto de pele total, com dimensão de 5x3 cm. No primeiro estudo, os animais receberam apenas uma aplicação da FBM na área receptora, com o objetivo de bioestimular o leito para receber o enxerto. No segundo estudo, os animais receberam a FBM no pós-cirúrgico imediato, 24 horas e 48 horas depois, totalizando três aplicações. Nos dois estudos, as análises foram feitas do 3º e do 7º dia após o procedimento, sendo coletadas capturas fotográficas e amostras biológicas. Os resultados do primeiro indicaram menor porcentagem de necrose e características morfológicas melhores com o laser 660 nm. Os resultados do segundo mostraram melhor desempenho do laser 808 nm, com percentuais de necrose menores e melhores condições morfológicas.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Terapia Laser de Baixa Intensidade; Enxerto de Pele; Reparação Tecidual.

ABSTRACT

The skin grafting technique is defined by the transfer of a skin segment to a damaged body area, without a vascular pedicle. The graft integration process is complex, since it is necessary to reestablish the blood supply and consequently many complications are triggered. To avoid recurrence, low-cost, easy-to-apply treatments are sought and with local actions that stimulate the healing process. Recently, laser photobiomodulation (PBM) began to be investigated in this area, due to its trophic-regenerative effects described in the literature for various skin wounds. However, the studies are still initial, with inconclusive protocols and dosimetry. In view of this, the objective of this thesis was to evaluate the relationship between power and irradiation time of laser PBM in fibroblasts, at red (660 nm) and infrared (808 nm) wavelengths, further investigating it as a therapeutic proposal to optimize the full-thickness skin grafts integration, when applied in the recipient area or as a post-surgical treatment. In the first study and in vitro, human skin fibroblast cells were irradiated with 1 J energy, 50 mW power and 20 s time or 100 mW power and 10 s time, for each wavelength. After evaluating cell proliferation and the inflammatory mediator interleukin-6 (IL-6), it was concluded that the association of higher potency with shorter irradiation time was more effective in stimulating fibroblasts and reducing IL-6. In the in vivo studies, 60 rats were used and all of them underwent full-thickness skin graft surgery, measuring 5x3 cm. In the first study, the animals received only one PBM application in the recipient area, with the aim of biostimulating the bed to receive the graft. In the second study, the animals received PBM immediately after surgery, 24 hours and 48 hours later, totaling three applications. In both studies, analyzes were performed on the 3rd and 7th day after the procedure, with photographic captures and biological samples being collected. The results of the first indicated a lower necrosis percentage and better morphological characteristics with the 660 nm laser. The results of the second showed better performance of the 808 nm laser, with lower necrosis percentages and better morphological conditions.

Keywords: Photobiomodulation; Low-Level Laser Therapy; Skin Graft; Tissue Repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Atividade mitocondrial, expressa em porcentagem, dos diferentes grupos e tempos, quando comparados ao controle	35
Figura 2 - Concentração de IL-6 nos períodos de 48 e 72 horas comparadas ao grupo controle	35
Figura 3 - Fotos representativas da técnica cirúrgica	44
Figura 4 - Representação da aplicação da FBM na área receptora	45
Figura 5 - Média e desvio padrão dos percentuais de necrose dos diferentes grupos, nos dois períodos avaliados	47
Figura 6 - Fotomicrografias representativas dos grupos, coradas com hematoxilina e eosina	48
Figura 7 - Fotos representativas do procedimento cirúrgico	55
Figura 8 - Representação do tratamento pós-operatório com FBM laser	56
Figura 9 - Média e desvio padrão das porcentagens de necrose dos diferentes grupos, nos dois períodos avaliados	59
Figura 10 - Representação em fotomicrografias dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, dos grupos investigados	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da FBM laser GaAsAl e InGaAlP utilizados	32
Tabela 2. Viabilidade celular avaliada pelo método azul de trypan após a FBM	34
Tabela 3. Parâmetros da FBM laser	45
Tabela 4. Parametrização da FBM laser utilizada em cada aplicação	57

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1 Inserção na linha de pesquisa do orientador e do programa	14
1.2 Parcerias nacionais e internacionais	14
1.3 Estágio (nacional e/ou internacional).....	15
1.4 Originalidade	15
1.5 Contribuição dos resultados da pesquisa para o avanço científico	15
1.6 Relevância social	16
1.7 Lista de referências de artigos, eventos/resumos, ou outros produtos.....	16
1.8 Link do currículo Lattes e ORCID	20
1.9 Descrição da tese para o público leigo.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
3. OBJETIVOS GERAIS	26
4. ARTIGOS / MANUSCRITOS	27
4.1 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	28
4.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i> : Fotobiomodulação na Área Receptora	40
4.3 ESTUDO <i>IN VIVO</i> : Fotobiomodulação no Tratamento Pós-Cirúrgico	52
5. CONCLUSÕES GERAIS	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7. REFERÊNCIAS	65

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Inserção na linha de pesquisa do orientador e do programa

A tese em questão foi desenvolvida por mim, Maria Carolina Derencio Oliveira, sob a orientação do Prof. Dr. Richard Eloin Liebano e coorientação da Dra. Patricia Brassolatti, junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPGFT) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Dentro do respectivo programa de pós-graduação, o docente está inserido na linha de pesquisa denominada “Recursos Fisioterapêuticos na Dor, Reparo Tecidual e Desempenho Funcional”.

Em conformidade com a linha de pesquisa, a tese é composta por 3 estudos experimentais, um *in vitro* e dois *in vivo*, que tiveram como objetivo central investigar parâmetros da fotobiomodulação laser para otimizar a integração de enxertos de pele de espessura total.

1.2 Parcerias nacionais e internacionais

O desenvolvimento desta tese dispôs das seguintes participações:

I. **Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal** (Departamento de Medicina, UFSCar - campus São Carlos) colaborou com infraestrutura para os desdobramentos do estudo *in vitro* “Investigação da relação potência e tempo de irradiação da fotobiomodulação laser em fibroblastos humanos”, submetido no periódico “*Lasers in Medical Science*” (fator de impacto: 2.555);

II. **Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte** (Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, UFSCar - campus São Carlos) e **Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal** (Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar - campus São Carlos) que gentilmente subsidiaram os estudos *in vivo*;

III. **DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda**, São Carlos, São Paulo, Brasil, por intermédio da **Fundação Nupen - Instituto de Pesquisas e Ensino na Área da Saúde**, que solicitadamente forneceu o equipamento Therapy XT, bem como colaborou na manutenção e calibração do mesmo.

Adicionalmente, o **Prof. Dr. Ivaldo Esteves Junior** (professor titular e coordenador do curso de fisioterapia da Universidade Paulista - UNIP) convidou a

doutoranda em questão e seu respectivo orientador para colaborarem com a elaboração do estudo “*Photobiomodulation effect in tumoral necrosis factor-alpha (TNF-) on the viability of random skin flap in rats*”, publicado no periódico “*Lasers in Medical Science*” (fator de impacto: 2.555).

1.3 Estágio (nacional e/ou internacional)

A aluna em questão foi impossibilitada de se candidatar a estágios tanto nacionais quanto internacionais, devido a pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (pandemia de COVID-19).

1.4 Originalidade

Na presente tese, primeiramente verificou-se a relação entre potência e tempo de irradiação da fotobiomodulação laser em um estudo *in vitro*, e os achados foram aplicados *in vivo*. Nessa sequência experimental, foram propostos dois protocolos de tratamento: intraoperatório, para bioestimular o leito antes de receber o enxerto de pele e potencializar sua integração; pós-operatório imediato seguido por mais dois dias, totalizando 3 irradiações dentro dos períodos de coagulação e parte do inflamatório do processo de cicatrização.

Então, a tese em questão é inovadora quanto a parametrização investigada da fotobiomodulação laser, posto que é uma temática complexa e ainda inconclusiva para diversos tratamentos, como no caso dos enxertos de pele. Para mais, o aprofundamento acerca dos efeitos trófico-regenerativos do laser em enxertos se faz fundamental para ampliar essa abordagem terapêutica, tornando-a mais assertiva.

1.5 Contribuição dos resultados da pesquisa para o avanço científico

Os resultados do estudo *in vitro* e dos estudos *in vivo* contribuem para o avanço científico acerca do uso da fotobiomodulação laser no reparo cutâneo. A literatura ainda busca compreender o mecanismo completo de ação da fotobiomodulação, assim como parâmetros mais específicos e eficazes para cada tipo de ferida cutânea.

Então, os resultados contidos nesta tese trazem informações novas sobre a inter-relação entre potência e tempo de irradiação, com a recente implementação da terapia laser na viabilidade de enxertos de pele total, investigada tanto no intraoperatório quanto no tratamento pós-cirúrgico.

1.6 Relevância social

São diversas as situações clínicas que usufruem da técnica de enxertia cutânea, e com frequência há a necessidade de um novo procedimento cirúrgico devido falhas na integração do enxerto. Esse ciclo contribui na sobrecarga do sistema de saúde, além de impactar na vida dos pacientes. Então, torna-se relevante associar uma abordagem terapêutica de fácil aplicação, baixo custo e com ações locais que beneficiem a regeneração do tecido transplantado.

Nessa perspectiva, o presente estudo traz a fotobiomodulação laser como uma terapia promissora para aumentar a viabilidade dos enxertos de pele, já que pode ser aplicada tanto no intraoperatório quanto no pós-operatório, sendo capaz de otimizar a recuperação dos pacientes e reduzir a taxa de reincidência. Além disso, essa temática realça uma atuação fisioterapêutica ainda pouco conhecida, principalmente no que tange à comunidade de um modo geral.

1.7 Lista de referências de artigos, eventos/resumos, ou outros produtos

Artigos Publicados

1. ESTEVES, G. R.; JUNIOR, I. E.; MASSON, I. F. B.; MACHADO, A. F. P.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; BALDAN, C. S.; FARCIC, T. S.; LIEBANO, R. E.; PLAPLER, H. *Photobiomodulation effect in tumoral necrosis factor-alpha (TNF- α) on the viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 37, p. 1495-1501, 2022. (fator de impacto: 2.555).*
2. ARAUJO, L. A. S.; FIRMINO, S. M.; CURCELLI, E. M.; MARTINS, M. J. V.; GUSMAO, A. A.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; MILAN-MATTOS, J.; SANTOS, P. B.; MARINHO, R. S.; VALADÃO, T. F. C.; LEIS, L. V.; BAZAN, S. G. Z.; CATAI, A. M.; LEAL, A. M. O.; ROSCANI, M. G. Avaliação da função cardiovascular e qualidade de vida em pacientes com insuficiência cardíaca com e sem comportamento sedentário. **Medicina (Ribeirão Preto - online)**, v. 54, p. e173130, 2021.
3. **OLIVEIRA, M. C. D.**; GRIFONI, T.; VAROTTO, N. R. Participação de meninas no *Futebol Callejero*: intervenção na Educação Física Escolar. **Motricidades: Revista da Sociedade de Pesquisa Qualitativa em Motricidade Humana**, v. 4, p. 15-26, 2020.

4. BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; KIDO, H. W.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; ALMEIDA-LOPES, L.; ZANARDI, L. M.; NAPOLITANO, M. A.; DE AVÓ, L. R. DA S.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; PARIZOTTO, N. A. *Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats*. **Journal of Tissue Viability**, v. 27, n. 4, p. 249-256, 2018. (fator de impacto: 3.374).
5. BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; ALMEIDA-LOPES, L.; ZANARDI, L. M.; NAPOLITANO, M. A.; DE AVÓ, L. R. DA S.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; PARIZOTTO, N. A. *Bacterial cellulose-based biomaterials on third-degree burns in rats*. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**, v. 1, p. 31-36, 2018.
6. BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; KIDO, H. W.; TIM, C. R.; ALMEIDA-LOPES, L.; AVÓ, L. R. DA S.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; PARIZOTTO, N. A. *Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats*. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 4, p. 313-320, 2016. (fator de impacto: 2.893).

Artigos Submetidos para Publicação

1. *Investigation of the relation between laser photobiomodulation power and irradiation time in human fibroblasts*.
Maria Carolina Derencio Oliveira; Patricia Brassolatti; Ana Laura Martins de Andrade; Genoveva Lourdes Flores Lima; Ângela Merice de Oliveira Leal; Nivaldo Antonio Parizotto; Richard Eloin Liebano.
 Periódico: **Lasers in Medical Science** (fator de impacto: 2.555).
2. *Biostimulation of the receptor area using laser photobiomodulation to improve full-thickness skin graft integration in rats*.
 Lara Maria Bataglia Espósito; **Maria Carolina Derencio Oliveira**; Luis Henrique Oliveira de Moraes; Camila Pereira Sabadini; Krissia Franco de Godoy; Rafael Afonso Derencio Oliveira; Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte; Fernanda de Freitas Anibal; Patricia Brassolatti; Richard Eloin Liebano.
 Periódico: **Journal of Tissue Viability** (fator de impacto: 3.374).

Artigos em Fase de Submissão

1. Modelos experimentais de retalho cutâneo randômico dorsal em ratos: uma revisão sistemática.
Lara Maria Bataglia Espósito; **Maria Carolina Derencio Oliveira**; Estefany Camila Bomfim dos Santos; Patricia Brassolatti; Richard Eloin Liebano.
2. Efeitos de diferentes comprimentos de onda da fotobiomodulação LED em células fibroblásticas dérmicas humanas: estudo *in vitro*.
Maria Carolina Derencio Oliveira; Patricia Brassolatti; Genoveva Lourdes Flores Lima; Ana Laura Martins de Andrade; Estefany Camila Bomfim dos Santos; Lara Maria Bataglia Espósito; Fernanda de Freitas Anibal; Richard Eloin Liebano.
3. Comparação entre dois comprimentos de onda da fotobiomodulação laser na modulação inflamatória e viabilidade de enxertos de pele total, em ratos.
Maria Carolina Derencio Oliveira; Patricia Brassolatti; Lara Maria Bataglia Espósito; Luis Henrique Oliveira de Moraes; Camila Pereira Sabadini; Krissia Franco de Godoy; Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte; Fernanda de Freitas Anibal; Richard Eloin Liebano.

Capítulo de Livro Publicado

OLIVEIRA, M. C. D.; VERA, M. A. A. ; LIEBANO, R. E. . Agentes eletrofísicos na saúde da mulher - conceitos básicos. In: Patricia Driusso; Mariana Arias Avila; Richard Eloin Liebano. (Org.). Agentes Eletrofísicos na Saúde da Mulher. 1 ed.: Thieme Revinter, 2021, v. 1, p. 3-9.

Resumos publicados em anais de congressos

1. ESPOSITO, L. M. B.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; BRASSOLATTI, P.; LIEBANO, R. E. Fotobiomodulação com laser vermelho e infravermelho no processo de integração de enxerto de pele total, em ratos. In: III FOTnS - Fórum Online de Tecnologias da Luz na Saúde, 2022, São Paulo. Anais do III Fórum On-line de Tecnologias da Luz na Saúde, 2022.
2. ESPOSITO, L. M. B.; **OLIVEIRA, M. C. D.**; BRASSOLATTI, P.; LIEBANO, R. E. Modelos experimentais de retalho cutâneo randômico dorsal, em ratos: uma

revisão sistemática. In: XXVIII Simpósio de Fisioterapia UFSCar - 'Fisioterapia e Tecnologia: estamos perto ou longe demais?', 2022, São Carlos. Anais do Evento 2022 - XXVIII Simpósio de Fisioterapia UFSCar, 2022.

Coorientação de Iniciação Científica

1. Aluna: Lara Maria Bataglia Espósito (Bolsista CNPq)

Projeto: Avaliação dos modelos experimentais de retalho cutâneo randômico dorsal em ratos: uma revisão sistemática. UFSCar - Curso de Fisioterapia - Ago/2020.

2. Aluna: Lara Maria Bataglia Espósito (Bolsista FAPESP)

Projeto: Fotobiomodulação com laser vermelho e infravermelho no processo de integração de enxerto de pele total, em ratos. UFSCar - Curso de Fisioterapia - Nov/2022.

Coorientação de Trabalhos de Conclusão de Curso

1. Aluna: Estefany Camila Bomfim dos Santos

Título: Efeitos de diferentes comprimentos de onda da fotobiomodulação LED em células fibroblásticas dérmicas humanas: estudo *in vitro*. UFSCar - Graduação em Fisioterapia - 2022.

2. Aluno: Vitor Monti Carmelo Donadoni

Título: Academias ao ar livre: uma revisão sistemática. UFSCar - Graduação em Educação Física - 2022.

3. Aluna: Lara Maria Bataglia Espósito

Título: Avaliação dos modelos experimentais de retalho cutâneo randômico dorsal em ratos: uma revisão sistemática. UFSCar - Graduação em Fisioterapia - 2021.

Participação em Bancas de Trabalho de Conclusão de Curso

1. Aluno: Matheus Moraes Mendonça

Título: Decifrando o “Dom de Jogar Bola”: mapeamento dos indicadores de qualidade de jogo no futebol infantil. UFSCar - Graduação em Educação Física - 2022.

2. Aluno: Gabriel Luis Mendes

Título: *Crossfit*: percepções de praticantes jovens. UFSCar - Graduação em Educação Física - 2022.

3. Aluna: Leticia Businaro Casarin

Título: Níveis de atividade física, qualidade de vida e tabagismo em estudantes de Educação Física. UFSCar - Graduação em Educação Física - 2019.

4. Aluno: Breno Perpétuo Lourenço

Título: Efeitos da hidroterapia e da educação terapêutica em dor na qualidade de vida e na dor de mulheres com fibromialgia - UFSCar - Graduação em Fisioterapia - 2018.

Participação em Bancas de Comissões Julgadoras

1. 4ª Edição do Meeting Internacional Multidisciplinar de Estética IBRAMED. Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos, Amparo, São Paulo, 2018.
2. I Encontro Científico do Curso de Especialização em Fisioterapia Neurofuncional. UFSCar, 2018.
3. XXIV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar e XIV Encontro de Ex-alunos. UFSCar, 2017.

1.8 Link do currículo Lattes e ORCID

Link do currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/8887606484271737>

Link do ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7816-7412>

1.9 Descrição da tese para o público leigo

Este estudo buscou os benefícios de dois tratamentos com laser para ajudar na cicatrização de enxertos de pele. Primeiro foi investigado a relação entre dois parâmetros do laser para compor a dose de aplicação; depois, essa dose foi estudada em animais de experimento científico. No tratamento feito no meio da cirurgia, o laser de cor vermelha ajudou na cicatrização, e no tratamento feito por três seguidos, foi o laser sem cor (infravermelho) que ajudou na cicatrização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Enxerto de pele

Define-se enxerto cutâneo como um segmento de pele retirado de uma área do corpo (área doadora) e transferido para uma região corpórea danificada (área receptora), no qual necessita restabelecer novo suprimento sanguíneo para assegurar sua integração (Alexandre *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2020). Há três preceitos mais usuais para categorizar os tipos de enxerto, sendo classificados quanto a espessura, a fonte de obtenção ou de acordo com a constituição histológica do tecido (Lofêgo Filho *et al.*, 2006).

Quando relacionada a espessura tecidual presente no enxerto, classifica-se em enxerto de espessura total (pele total) e de espessura parcial (pele parcial) (Hierner *et al.*, 2005). O primeiro consiste na presença da epiderme e toda a espessura da derme da área doadora, e o seguinte se caracteriza pela preservação de parte da derme na área doadora (Alexandre *et al.*, 2007; Carvalho, 2015), possibilitando assim sua devida reepitelização (Castro *et al.*, 1994; Baldi; Amaral, 2002).

A respeito da fonte de obtenção, tem-se quatro subcategorias (Andreassi *et al.*, 2005). No auto-enxerto ou enxerto autógeno, o doador e o receptor são o mesmo indivíduo; diferentemente do aloenxerto ou homoenxerto, em que o doador e o receptor são indivíduos diferentes da mesma espécie (Castro *et al.*, 1994; Andreassi *et al.*, 2005). Já o isoenxerto compreende indivíduos geneticamente idênticos, e o xenoenxerto, também denominado heteroenxerto ou zoenxerto, designa-se quando o doador e o receptor são indivíduos de espécies distintas (Baldi; Amaral, 2002; Teixeira Neto *et al.*, 2010).

Já na classificação que considera a constituição histológica, os enxertos são conceituados como simples ou composto (Ishida; Shiroma, 1992). Quando simples, o enxerto é constituído exclusivamente por um único tipo de tecido; quando composto, o enxerto se constitui de uma porção intacta de toda a epiderme e derme, com um componente adicional de gordura ou cartilagem (Ishida; Shiroma, 1992; Lofêgo Filho *et al.*, 2006; Teixeira Neto *et al.*, 2010).

A enxertia cutânea é uma das técnicas mais utilizadas na cirurgia plástica reparadora, uma vez que busca cobrir a perda significativa de pele decorrente de diversas situações clínicas (Andreassi *et al.*, 2005). São exemplos: queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes, necrose de pele após um trauma ou

cirurgia, deformidades congênitas que se submeteram a correções cirúrgicas (Young; Fowler, 1998; Alves; Corrêa; Liebano, 2009; Ferreira *et al.*, 2011), pé diabético, feridas nos membros inferiores consecutivas a má circulação, deformidades ou excisões de neoplasia (Audrain; Bray; de Berker, 2015; Castro *et al.*, 2020).

Dados indicam que, por ano, mais de 6 milhões de pacientes necessitam de enxerto de pele devido a queimaduras (Harrison; Macneil, 2008), sem contabilizar as tantas outras demandas clínicas citadas. Contudo, a implementação desse tecido em um novo leito pode desencadear resultados estéticos e funcionais não satisfatórios via complicações pós procedimento, que podem levar à perda do enxerto (Alves; Corrêa; Liebano, 2009).

A principal complicação consiste na necrose tecidual, no qual cerca de 20% dos enxertos de pele de espessura total sofrem algum grau de ausência no suprimento sanguíneo (Gonçalves *et al.*, 2007; Martignago *et al.*, 2019). O bloqueio da vascularização pode ocorrer mediante o acúmulo de fluidos, como seroma e/ou hematoma, que geram uma barreira entre o enxerto e o leito, e juntamente aos movimentos de cisalhamento levam à separação mecânica do tecido (Mcgregor; Mcgregor, 1995; Alves; Corrêa; Liebano, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Stanley *et al.*, 2013).

Outras falhas no processo de integração do enxerto advêm da presença de infecções e discromia, que alteram o comportamento fisiológico da cicatrização (Lofêgo Filho *et al.*, 2006). Ainda, há a possibilidade de contração da pele, que reduz a mobilidade articular e possivelmente repercute na perda de função (Harrison; Macneil, 2008; Martignago *et al.*, 2019).

Diante da alta aplicabilidade da enxertia cutânea e dos desfechos insatisfatórios derivados, buscam-se meios que sejam eficientes para estimular a integração da pele enxertada e maximizar os resultados funcionais e estéticos, para que não seja necessário um segundo procedimento cirúrgico (Moreira *et al.*, 2020). Como o enxerto não possui suprimento sanguíneo próprio, sua integração depende de fatores que contribuem para o processo cicatricial, objetivando viabilizar melhor epitelização, maior resistência ao tecido, com boa textura e coloração (Andreassi *et al.*, 2005; Miraliakbari; Mackay, 2006; Carvalho, 2015; Reis Filho *et al.*, 2017; Martignago *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2020).

Fotobiomodulação laser na integração de enxerto de pele

A fotobiomodulação (FBM) laser corresponde a uma terapia com luz monocromática, coerente e de baixa potência, que atua na aceleração de processos regenerativos. Sua ação terapêutica alcança diferentes tecidos biológicos, com destaque para os efeitos trófico-regenerativos (Sobranko; Alster, 2008; de Andrade *et al.*, 2017) via estimulação da atividade mitocondrial, proliferação celular, fatores de crescimento e síntese proteica. (da Silva *et al.*, 2013; Kazemikhoo *et al.*, 2018).

Em adição, a FBM também intensifica a proliferação de fibroblastos, que resulta na melhora da síntese e reorganização do colágeno (Otterço *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2020), além de induzir a angiogênese, aumentando a microcirculação local, a perfusão tecidual e o tecido de granulação (Vaghardoost *et al.*, 2018; Kazemikhoo *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2020). Ainda, há outros benefícios relevantes, como: diminuição e absorção de hematomas e edema; modulação de mediadores inflamatórios; contração da ferida; produção de analgesia (Piva *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2013; Reis Filho *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2020).

Mesmo diante de tantas vantagens terapêuticas, o que se sabe até o momento sobre o mecanismo de ação da FBM origina-se com Passarella e Karu (2014), que foram os pioneiros a indicarem os cromóforos mitocondriais como responsáveis pela absorção da energia luminosa, com destaque para o citocromo c oxidase (CCO) que parece atuar como fotorreceptor e transdutor da FBM (Karu, 2010). Então, uma vez que a luz do laser é absorvida, ocorre aceleração da cadeia transportadora de elétrons, aumento do potencial de membrana e do metabolismo oxidativo, modificando as concentrações de adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio (EROS), cálcio e óxido nítrico (Huang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014; de Freitas; Hamblin, 2016).

Essas alterações nos elementos da sinalização mitocondrial dissociam o óxido nítrico, permitindo às EROS ativar numerosas vias de sinalização intracelular (Hamblin, 2018) que resultarão nos benefícios que a FBM proporciona, de acordo com o espectro de luz absorvido. No caso do CCO, a eficiência para mediar os componentes da sinalização celular ocorre pela absorção da luz visível (vermelho), ideal para tratamentos de pele (de Andrade; de Lima; de Albuquerque, 2010; Karu, 2010), e luz não visível (infravermelho), que também gera estímulos para acelerar a cicatrização de feridas (Karu, 2010; Fathabadie *et al.*, 2013).

Concomitante aos espectros de luz vermelho e infravermelho, que compreendem os comprimentos de onda entre 600-1070 nanômetros (nm) (Chung *et al.*, 2012), há os parâmetros inter-relacionados que fazem a escolha da dosimetria ser altamente complicada. Por mais que a FBM seja estudada desde sua primeira utilização no reparo cutâneo (Mester *et al.*, 1971; Chung *et al.*, 2012), seu uso para estimular a viabilidade de enxertos de pele é recente, o que amplia ainda mais as controvérsias em relação aos parâmetros e protocolos disponíveis na literatura.

Os estudos experimentais de laser em enxerto de pele trazem da Silva *et al.* (2013) que realizaram o tratamento aplicando fluência de 6 joules por centímetro quadrado (J/cm^2), por 18 segundos (s) no pós-operatório imediato, 72 horas e no 7º dia após o procedimento, sem mais detalhes. Reis Filho *et al.* (2017), por sua vez, utilizaram o comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 miliwatts (mW), fluência de $4 \text{ J}/\text{cm}^2$, tempo de irradiação de 8 s em cada ponto e sendo 12 pontos irradiados, também no pós-operatório imediato, 72 horas e no 7º dia após o procedimento.

Castro *et al.* (2019) exploraram o laser de 660 nm, potência de 40 mW, fluência de $60 \text{ J}/\text{cm}^2$, energia de 2,4 J por ponto, irradiados por 60 s cada, totalizando 12 pontos e dos quais 2 foram aplicados em cima do enxerto e 10 ao redor do mesmo. Ainda, o tratamento iniciou-se no pós-operatório imediato e a cada 24 horas, totalizando 7 aplicações. Já de Souza *et al.* (2019) compararam os comprimentos de onda 660 nm e 830 nm, com parâmetros fixos: potência de 30 mW, fluência de $10 \text{ J}/\text{cm}^2$, energia de 0,28 J por ponto, irradiados por 9,34 s cada, no total de 13 pontos. O tratamento iniciou-se no 3º dia pós-operatório, quando foi retirado o curativo compressivo, e foi estendido por sete dias consecutivos.

Ademais, Moreira *et al.* (2020) também usaram o comprimento de onda de 660 nm, na potência de 30 mW, irradiando 15 pontos distribuídos nas margens e no centro do enxerto. Cada ponto foi irradiado por 12 s com fluência de $6 \text{ J}/\text{cm}^2$, ou por 20 s com fluência de $10 \text{ J}/\text{cm}^2$, e o tratamento de cada dosimetria foi realizado em duas frequências, sendo a cada 3 ou 5 dias do pós-operatório até completar 15 dias do procedimento.

Diante dos estudos encontrados na literatura, fica explícito que as evidências são escassas e conseqüentemente há uma importante lacuna a ser percorrida. Nos parâmetros investigados até o momento, somente um estudo utilizou fluência maior que $10 \text{ J}/\text{cm}^2$, assim como apenas um comparou o comprimento de onda vermelho com o infravermelho e só foram testadas potências de até 40 mW. Adicionalmente,

todos os protocolos abordam a terapia no pós-operatório, não sendo encontrados estudos que avaliem a ação da FBM laser aplicada previamente à colocação do enxerto, no intuito de estimular e preparar o leito para receber o tecido.

Portanto, torna-se necessário ampliar os conhecimentos acerca dos protocolos e parâmetros da FBM laser, tal como a inter-relação entre os parâmetros, objetivando otimizar a integração de enxertos de pele e com perspectivas futuras à prática clínica.

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a relação potência e tempo de irradiação da FBM laser em fibroblastos humanos *in vitro*, com posteriori análises dos efeitos da terapia com FBM laser aplicada na área receptora, ou como tratamento pós-cirúrgico, para otimizar a integração de enxerto de pele total em um modelo experimental *in vivo*.

4. ARTIGOS / MANUSCRITOS

1. ESTUDO IN VITRO

Investigação da relação potência e tempo de irradiação da fotobiomodulação laser em fibroblastos humanos

Submetido no periódico: "*Lasers in Medical Science*".

2. ESTUDO IN VIVO: Fotobiomodulação na Área Receptora

Bioestimulação da área receptora com fotobiomodulação laser para otimizar a integração de enxerto de pele total, em ratos

Submetido no periódico: "*Journal of Tissue Viability*".

3. ESTUDO IN VIVO: Fotobiomodulação no Tratamento Pós-Cirúrgico

Comparação entre dois comprimentos de onda da fotobiomodulação laser na modulação inflamatória e viabilidade de enxertos de pele total, em ratos

Em fase de submissão.

4.1 ESTUDO *IN VITRO*

Investigação da relação potência e tempo de irradiação da fotobiomodulação laser em fibroblastos humanos

Maria Carolina Derencio Oliveira¹, Patricia Brassolatti², Ana Laura Martins de Andrade¹, Genoveva Lourdes Flores Lima³, Ângela Merice de Oliveira Leal⁴, Nivaldo Antonio Parizotto¹, Richard Eloin Liebano^{1,5}

¹ Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

² Departamento de pesquisa, desenvolvimento e inovação, Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos (IBRAMED), Amparo - SP, Brasil.

³ Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁵ Department of Rehabilitation Sciences, University of Hartford, West Hartford, CT, Estados Unidos.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) e os níveis de interleucina 6 (IL-6) submetidos a fotobiomodulação (FBM) com laser vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm) em duas potências distintas, com curto período de irradiação *versus* prolongado período de aplicação. **Métodos:** Foram cultivadas células HDFn distribuídas em 5 grupos, dos quais 1 foi submetido à irradiação simulada (GC) e 4 receberam a mesma energia da FBM, em dois diferentes tempos de irradiação (10 s *versus* 20 s) associados às diferentes potências (50 mW *versus* 100 mW), nos respectivos comprimentos de onda. As irradiações ocorreram nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o inóculo. Em cada período, foram avaliadas viabilidade celular, atividade mitocondrial e concentração IL-6. Foi utilizado o teste ANOVA two-way com *post hoc* de Tukey para diferenças entre os grupos e nível de significância de 5%. **Resultados:** A FBM manteve a viabilidade celular nos diferentes tempos e grupos. Em 48 horas, apenas 1 grupo irradiado não apresentou redução na concentração de IL-6. Em 72 horas, a concentração de IL-6 reduziu significativamente nos 4 grupos irradiados, e houve aumento da atividade mitocondrial nos dois grupos irradiados com a maior potência e curto tempo de aplicação. **Conclusão:** A FBM com potência maior (100 mW) e curto tempo de irradiação (10 s), nos dois comprimentos de onda utilizados, foi eficaz para estimular a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos e para a redução da IL-6.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Fibroblastos Dérmicos Humanos; Proliferação Celular; Interleucina 6; Estudo *in vitro*; Terapia Laser de Baixa Intensidade.

4.1.1 Introdução

A terapia laser de baixa intensidade, recentemente denominada como terapia por fotobiomodulação (FBM), consiste em um tratamento não farmacológico que, através da luz, proporciona diversos benefícios terapêuticos (Engel; Khan; Arany, 2016). Dentre suas funcionalidades, destaca-se o estímulo para a cicatrização de diferentes tipos de feridas cutâneas, uma vez que seus efeitos fotobiomoduladores aceleram a reparação tecidual mediante neovascularização, síntese proteica, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (Barboza *et al.*, 2014; Szezerbaty *et al.*, 2018).

No tecido cutâneo, a proliferação celular pode ser estimulada pela luz vermelha e infravermelha, entre os comprimentos de onda de 600-760 nm e 780-1000 nm, respectivamente (George; Hamblin; Abrahamse, 2018). A ação da luz age diretamente nos fotorreceptores da membrana plasmática mitocondrial, mais especificamente no citocromo C oxidase presente na cadeia respiratória (Karu, 2010). A energia absorvida é convertida em energia metabólica, a qual desencadeia diversas respostas biológicas, tais como aumento da síntese de ATP, mudanças na concentração de espécie reativa de oxigênio (EROS), cálcio e óxido nítrico (Karu, 2010; Kim, 2014).

Estudos também relatam os efeitos bioestimulatórios da FBM em diversos tipos celulares (de Andrade *et al.*, 2019), entre eles os fibroblastos (Webb; Dyson; Lewis, 1998; Almeida-Lopes *et al.*, 2001; Webb; Dyson, 2003; Ayuk; Abrahamse; Houreld, 2018; Harorli; Hatipoglu; Erin, 2019). Almeida-Lopes *et al.* (2001) destacam que o aumento na proliferação de fibroblastos está relacionado com o tempo de aplicação, independente do comprimento de onda utilizado. Similarmente, Ayuk *et al.* (2018) acrescentam que a FBM é capaz de diminuir os fatores envolvidos na degradação da matriz extracelular e regular positivamente a síntese proteica, o que contribui para as fases de proliferação e remodelamento.

Além disso, Basso *et al.* (2015) apontam que o laser infravermelho com potência menor (25 mW) modula a expressão de fatores relacionados com a modulação da inflamação, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6). Harorli *et al.* (2019), por sua vez, apontam que a ação da FBM para modular citocinas inflamatórias, como no caso da IL-6, está intimamente relacionada à escolha dos parâmetros, com enfoque para o tempo de irradiação e ao número de aplicações da FBM.

Com isso, nota-se que a parametrização da FBM laser ainda não está totalmente elucidada, principalmente quando se relaciona qual o melhor tempo de aplicação e potência necessários para desencadear o mecanismo de proliferação celular no modelo *in vitro*. Sendo assim, é imprescindível destacar que a escolha do comprimento de onda, tempo de irradiação e potência precisam ser adequados para o efeito terapêutico desejado, caso contrário, poderão não surtir efeitos ou mesmo ser inibitórios e prejudiciais (Otterço *et al.*, 2018).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos e os níveis de IL-6 submetidos a FBM em duas potências distintas, com curto período de irradiação *versus* prolongado período de aplicação, nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, para assim compreender melhor a ação da luz laser e seus mecanismos biológicos, e com isso propor a elaboração de protocolos eficazes.

4.1.2 Métodos

As células utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFCV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus São Carlos.

Cultura celular

Foram cultivadas células fibroblásticas dérmicas humanas, da linhagem HDFN, em frascos T (Greiner, EUA) de 75 cm² mantidos na incubadora com temperatura de 37°C, 5% de CO₂ e umidade controlada (Thermo Scientific®, EUA). Dentro dos frascos T foi adicionado meio DMEM (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, EUA), antibiótico PEN/STREP 1% (Gibco, EUA), L-glutamina, Hepes e Bicarbonato (Sigma-Aldrich, EUA).

Quando as células atingiram uma confluência adequada (80 a 90%), essas foram inoculadas a 1×10^4 por poço em placas de 48 poços (KASVI, BRA) semeadas de modo intercalado, ou seja, um poço entre os semeados foi deixado vazio para prevenir possíveis dispersões da FBM. Durante todo período experimental, as placas foram mantidas na incubadora, sendo retiradas apenas para as irradiações com a FBM.

Protocolo da terapia laser

O equipamento utilizado para as emissões com laser foi o modelo Therapy XT (DMC Equipamentos-LTDa. São Carlos/SP, Brasil), com diodos Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAsAl) e Alumínio Gálio Índio Fósforo (InGaAIP), nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm), respectivamente. Foram utilizadas as potências de 50 mW e 100 mW, com energia fixa de 1 J e área transversa do feixe de 0,04 cm².

O aparelho foi posicionado em um suporte, de forma perpendicular, a uma distância de 3,34 cm da ponta da caneta laser até o fundo de cada poço, para que a FBM recobrisse todo o poço. Foram irradiados quatro grupos, com técnica de aplicação pontual e modo de emissão contínua, enquanto o grupo controle recebeu a irradiação de forma simulada.

Tabela 1: Parâmetros da FBM laser GaAsAl e InGaAIP utilizados.

	GC	GL	GL	GL	GL
		660-50	808-50	660-100	808-100
Comprimento de Onda (nm)	-	660	808	660	808
Potência (mW)	-	50	50	100	100
Tempo (s)	-	20	20	10	10
Densidade de Energia (J/cm²)	-	25	25	25	25
Energia (J)	-	1	1	1	1
Irradiância (mW/cm²)	-	1.250	1.250	2.500	2.500

As placas receberam a FBM nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a semeadura. As avaliações foram realizadas nos três períodos, sempre com intervalo de 24 horas da última irradiação, totalizando assim um máximo de três aplicações. Em cada período, foram avaliadas a atividade mitocondrial pela citotoxicidade, viabilidade e densidade celular, e a concentração de IL-6.

Citotoxicidade e viabilidade celular

Foi utilizado o método colorimétrico pelo 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA) de citotoxicidade celular, para avaliar a atividade mitocondrial. As placas ficaram incubadas por 4 horas e, após esse período, foi adicionado Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA) para solubilizar os cristais de formazam. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância por um leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®, EUA), com comprimento de onda de 501nm.

Na avaliação da viabilidade e densidade celular, foi utilizado o método de exclusão do corante azul de trypan (solução 4%, Gibco, EUA). Foram retiradas alíquotas de 20 µL, misturadas com 20 µL da solução etílica 0,4% (v/v) azul de trypan, e agitadas. Essa mistura foi homogeneizada e depositada no hemocitômetro para as contagens das células, que foram realizadas por dois examinadores experientes e cegos ao estudo. Para as contagens, foi utilizado o microscópio modelo BX51 (Olympus, Japão).

Detecção da citocina interleucina-6

A concentração de IL-6 presente nos períodos de 24, 48 e 72 horas após as irradiações foi quantificada pelo kit ELISA (MyBioSource, California, USA). Foram utilizadas microplacas de alta afinidade com anticítocina monoclonal, e uma série de soluções padrão de dupla diluição foi preparada, seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi medida a 450 nm em um espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), e as concentrações foram calculadas a partir de uma curva padrão. Os resultados foram transformados em porcentagem (%) para a análise estatística.

Análise estatística

Para garantir a reprodutibilidade dos dados, o experimento foi realizado em triplicata. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (Versão 7.04 for Windows), no qual os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e as diferenças entre os grupos foram verificadas pelo teste de ANOVA two-way, com *post hoc* de Tukey. Foram considerados os valores com nível de significância de 5%.

4.1.3 Resultados

A tabela 2 apresenta os valores da viabilidade celular obtidos pelo teste de exclusão azul de trypan, nos diferentes tempos e grupos. Todos os parâmetros da FBM utilizados mantiveram as características celulares viáveis, demonstrando assim que o laser não prejudicou a proliferação celular.

Tabela 2: Viabilidade celular avaliada pelo método azul de trypan após a FBM.

	GC	GL 660-50	GL 660-100	GL 808-50	GL 808-100
24h	100	100,31 ± 2,7	97,22 ± 5,2	98,58 ± 1,4	99,93 ± 2,1
48h	100	93,17 ± 6,1	99,60 ± 5,1	109,07 ± 18,8	118,41 ± 21,6
72h	100	96,54 ± 1,3	114,71 ± 7,4	120,09 ± 5,4	105,79 ± 21,2

Valores expressos em média ± desvio padrão. Não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0.05$).

Em relação a atividade mitocondrial, avaliada pelo teste do MTT e apresentada na figura 1, observou-se que nos dois primeiros períodos não houve diferenças estatísticas significantes ($p > 0.05$). No período de 72 horas, os grupos GL660-100 e GL808-100 tiveram um aumento significativo da absorbância em relação ao GC ($p < 0.05$). Já na avaliação entre os grupos irradiados, o GL808-50 apresentou-se significativamente inferior quando comparado aos GL660-100 e GL808-100 ($p < 0.05$).

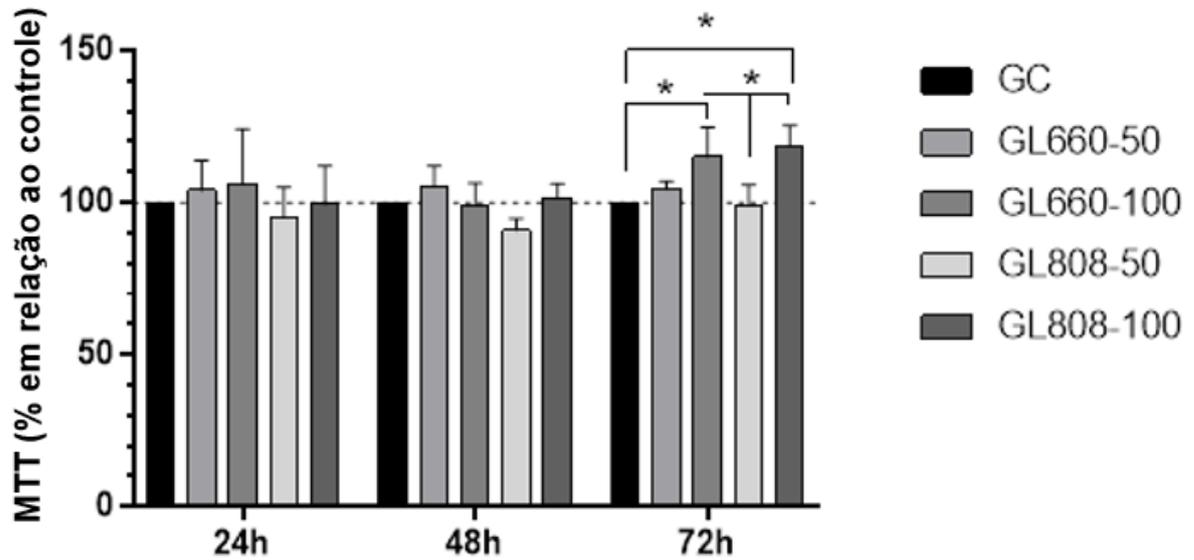


Figura 1 - Atividade mitocondrial, expressa em porcentagem, dos diferentes grupos e tempos, quando comparados ao controle. (*) Diferença significativa ($p < 0.05$).

A figura 2 mostra a concentração de IL-6 expressa nos períodos de 48 e 72 horas de cada grupo, visto que no período de 24 horas não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Em 48 horas, nota-se que apenas o GL808-50 não apresentou diferenças significantes em relação ao GC, e os demais grupos irradiados tiveram uma redução significativa da IL-6 ($p < 0.05$) quando comparados ao GC. Já no período de 72 horas, todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao GC ($p < 0.001$).

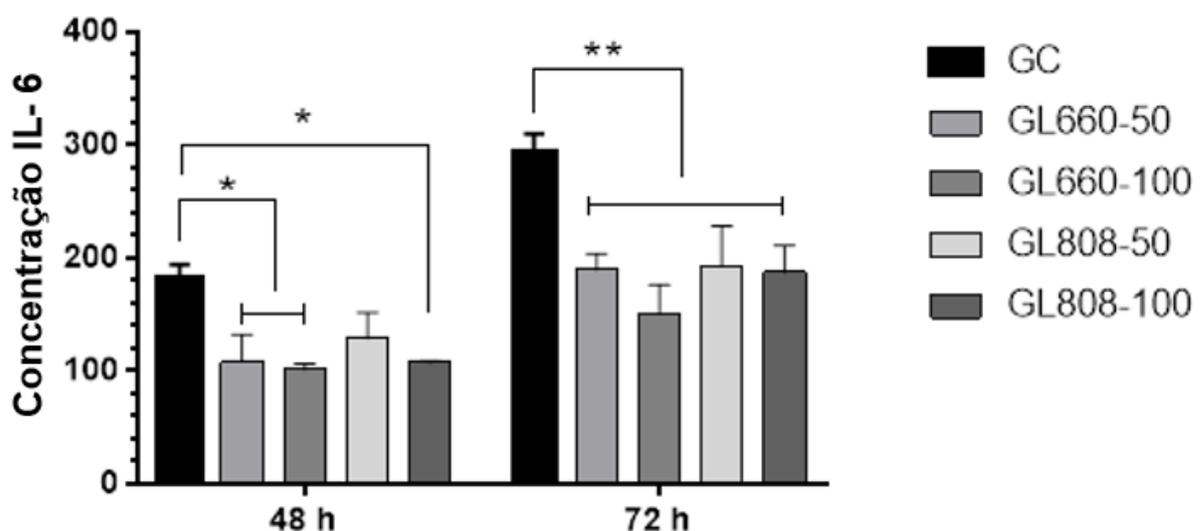


Figura 2 - Concentração de IL-6 nos períodos de 48 e 72 horas comparadas ao grupo controle. Diferenças significantes: (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.001$.

4.1.4 Discussão

FBM é o termo recentemente empregado para descrever o uso de fontes de luz como recursos terapêuticos que beneficiam diversas afecções, das quais a regeneração e cicatrização tecidual são frequentemente apontadas. A aplicação dessa terapia segue alguns padrões conceituais e clínicos como o uso de baixas doses de irradiação biofotônica não ionizante e não térmica que são capazes de interagirem com o ambiente biológico, desencadeando assim respostas específicas em três vertentes distintas como modulação da inflamação, alívio da dor e regeneração de tecidos (Avci *et al.*, 2013; Engel; Khan; Arany, 2016).

Contudo, apesar dos expressivos relatos na literatura sobre o assunto e seus possíveis efeitos (Fávaro-Pípi *et al.*, 2011; Bossini *et al.*, 2012; Avci *et al.*, 2013; Basso *et al.*, 2015; Trajano *et al.*, 2015; Brassolatti *et al.*, 2016; Ayuk; Abrahamse; Houreld, 2018; Otterço *et al.*, 2018; de Andrade *et al.*, 2019), informações de comparação a respeito do tempo de irradiação associado a potência, para desencadear os estímulos de interesse em um ambiente celular específico, ainda permanecem insatisfatórios. Devido a isso, o atual estudo buscou avaliar e comparar a taxa de proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos e os níveis de IL-6 submetidos a FBM de estímulo rápido com potência maior *versus* irradiação mais prolongada com potência menor, nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

Autores como Karu (2010) e Hamblin (2018) descrevem que os principais mecanismos de atuação da FBM concentram-se na aceleração da atividade da cadeia transportadora de elétrons desencadeada por fotoceptores intrínsecos presentes na mitocôndria. Além disso, chamam a atenção para a importância dos efeitos bifásicos descritos pela lei de Arndt-Schulz, considerados requisitos básicos para eleger conceitualmente uma dose ideal e conseqüentemente obter a resposta celular desejada (Hawkins; Houreld; Abrahamse, 2005). Entretanto, apesar de alguns estudos *in vitro* compararem as respostas moleculares e biológicas desencadeadas pelos dois diferentes comprimentos de onda mais utilizados terapêuticamente (vermelho e infravermelho), poucas evidências são encontradas sobre os efeitos dependentes do tempo de irradiação associado à potência.

Em relação ao espectro de luz vermelho da FBM, Hawkins, Houreld e Abrahamse (2005) relataram em seu estudo, com cultura de fibroblastos de pele humana, que uma única dose de 5 J/cm² ou exposições múltiplas com 2,5 J/cm² são capazes de promoverem estímulos mitocondriais, resultando na proliferação de

fibroblastos, sem danificar as células. Similarmente, Szezerbaty *et al.* (2018) também investigaram os efeitos do laser 660 nm com a mesma fluência do estudo anterior, em cultura de fibroblastos, e relataram efeitos positivos relacionados à melhor organização e distribuição do citoesqueleto celular, com maior descondensação da cromatina. Ainda, destacaram que os parâmetros utilizados foram eficazes em aumentar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e, em contrapartida, reduzir a expressão da IL-6.

Interessantemente, os dois estudos citados acima utilizaram potências consideradas baixas (aproximadamente 35 mW) e longos períodos de exposição, o que contradiz com os achados deste estudo, em que se observou que as maiores potências com menores tempos de irradiação, em ambos os comprimentos de onda, favorecem a atividade mitocondrial, relacionada diretamente com a viabilidade celular. De forma complementar, Flores Luna *et al.* (2020) obtiveram os resultados mais favoráveis no aumento da atividade mitocondrial com laser 660 nm, potência de 40 mW, energia de 0,84 J e consequente tempo de aplicação de 21 s. Mediante a parametrização investigada por Flores Luna *et al.* (2020), constata-se que os mesmos resultados foram obtidos neste estudo associando uma potência mais alta a um estímulo mais rápido, e não apenas no espectro de luz vermelho, mas também no infravermelho.

Por sua vez, Maldaner *et al.* (2019) também apresentaram resultados relacionados a aplicação do laser 660 nm, potência de 35 mW e curtos períodos de irradiação (10 s, 14 s, 16 s, 20 s e 28 s), porém, com aplicação pulsada. Neste caso, os autores relatam que a FBM foi capaz de minimizar os impactos desencadeados pelo peróxido de hidrogênio utilizado para simular os efeitos do envelhecimento natural em fibroblastos dérmicos, destacando assim a importância do laser para a proteção e proliferação celular. No entanto, apesar dos tempos de exposições serem próximos aos utilizados em nosso estudo, a comparação dos dados torna-se difícil e ainda contraditória, visto que Maldaner *et al.* (2019) utilizaram o modo de aplicação pulsado, enquanto o nosso estudo utilizou o modo contínuo, além dos valores das potências também serem diferentes. Adicionalmente, os autores relataram efeitos positivos no ambiente celular, o que também foi observado em nosso estudo, que constatou os mesmos efeitos benéficos no ambiente celular quando exposto a FBM com potência quase três vezes maior do que o utilizado por Maldaner *et al.* (2019).

Estudos comparativos como o de Ayuk *et al.* (2018) que avaliou os efeitos de ambos os comprimentos de onda, 660 e 808 nm (108 mW e 94 mW respectivamente, e 5 J/cm²), em dois tipos celulares diferenciados, fibroblastos normais e fibroblastos representando as condições de hipóxia diabética, apontaram que esses dois comprimentos de onda foram capazes de reduzir o ambiente proteolítico e aumentar os níveis de expressão de colágeno do tipo I, especialmente nas células danificadas. Analisando esses achados acerca dos efeitos positivos da luz infravermelha, em uma potência considerada maior do que nos estudos anteriores e muito próxima da utilizada em nosso estudo, é possível corroborar nossos achados com os de Ayuk *et al.* (2018), uma vez que a melhora do estado proteolítico pode auxiliar em um ambiente mais favorável para a proliferação celular.

Almeida-Lopes *et al.* (2001) também compararam diferentes comprimentos de onda na proliferação de fibroblastos gengivais. Os autores demonstram que o laser infravermelho auxiliou significativamente no crescimento de células que apresentavam déficits nutricionais, quando comparado ao laser vermelho, e concluíram que irradiações mais rápidas da FBM foram mais benéficas. Em partes, tais relatos corroboram com alguns dados obtidos neste estudo, pois observamos que o uso do laser infravermelho, com potência maior e menor tempo de aplicação da FBM, apresentou as melhores respostas celulares avaliadas.

Todavia, Damante *et al.* (2009) destacam em seu estudo que a proliferação celular não é o único evento biológico que deve ser levado em consideração, e ainda apontam que a luz infravermelha tem um efeito positivo na produção de fatores de crescimento indispensáveis para sobrevivência e função celular. Em vista disso, outro aspecto extensamente discutido na literatura acerca dos mecanismos de ação da FBM consiste em sua atuação direta para produção ou inibição de citocinas anti e pró inflamatórias, visto que, dependendo da dose aplicada, a FBM age como moduladora de processos inflamatórios.

As citocinas são mediadores diretamente relacionados ao processo de cicatrização, uma vez que essas moléculas promovem recrutamento, migração e proliferação celular (Huang *et al.*, 2011; Basso *et al.*, 2015). Contudo, níveis altos de citocinas pró inflamatórias, como a IL-6, podem estar relacionados a desarranjos teciduais ou mesmo nos quadros de inflamações crônicas. Estudos como o de Basso *et al.* (2015) reportam que a FBM pode promover a biomodulação de citocinas inflamatórias juntamente com a síntese de fibroblastos gengivais, e que a aplicação

do laser infravermelho, com doses entre 3 e 6 J e potência de 25 mW, podem reduzir a expressão do TNF- α e IL-6.

Similarmente, o estudo de Harorli, Hatipogli e Erin (2019) destacaram que, em doses adequadas, a FBM pode atuar como importante modulador de citocinas como a IL-6 e IL-8, discutindo que a ação desta terapia está estritamente relacionada com as doses aplicadas e ao tipo de laser utilizado. Esses resultados corroboram com nosso estudo, pois foi possível observar que em todos os parâmetros investigados houve reduções na expressão da IL-6, sendo ainda mais significativos nos grupos com maior potência e breve exposição à FBM, nos dois comprimentos de onda utilizados.

4.1.5 Conclusão

A FBM atua como um recurso eficaz na proliferação de fibroblastos dérmicos e para modular citocinas pró-inflamatórias. Ressalta-se que a associação entre potências maiores e irradiações de curtos tempos é uma parametrização norteadora para a elaboração de protocolos eficazes.

4.2 ESTUDO *IN VIVO*: Fotobiomodulação na Área Receptora

Bioestimulação da área receptora com fotobiomodulação laser para otimizar a integração de enxerto de pele total, em ratos

Lara Maria Bataglia Espósito¹, Maria Carolina Derencio Oliveira¹, Luis Henrique Oliveira de Moraes², Camila Pereira Sabadini², Krissia Franco de Godoy³, Rafael Afonso Derencio Oliveira⁴, Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte⁵, Fernanda de Freitas Anibal³, Patricia Brassolatti⁶, Richard Eloin Liebano^{1,7}

¹ Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

³ Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁴ Mestrado Profissional em Gestão de Organizações de Saúde, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto / SP, Brasil.

⁵ Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁶ Departamento de pesquisa, desenvolvimento e inovação, Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos (IBRAMED), Amparo - SP, Brasil.

⁷ Department of Rehabilitation Sciences, University of Hartford, West Hartford, CT, Estados Unidos.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a ação da fotobiomodulação na área receptora para otimizar a integração de enxertos de pele total. **Métodos:** Trinta e seis ratos Wistar foram alocados em três grupos: laser vermelho (660 nm), laser infravermelho (808 nm) e controle. Em todos os grupos, um segmento de pele de 5x3 cm foi removido, seguido pela dissecação do músculo panículo carnoso. No grupo controle, a pele foi recolocada após uma rotação de 180°. Nos grupos laser, primeiro o leito recebeu irradiação com energia total de 6 J e depois a pele foi recolocada. A eutanásia ocorreu no 3º e 7º dia pós-operatório, quando foram coletadas capturas fotográficas e amostras teciduais. Na análise estatística utilizou-se os testes Anova-Two way com post hoc de Tukey, Kruskal Wallis e Friedman com *post hoc* de Dunn. **Resultados:** O grupo 660 nm atingiu os menores percentuais de necrose, mostrando-se mais eficaz que o grupo 808 nm no 7º dia, e a necrose aumentou consideravelmente entre os dois períodos no grupo 808 nm. Os grupos controle e 660 nm apresentaram aspectos morfológicos semelhantes, porém o grupo 808 nm exibiu alterações expressivas na fibrose e no infiltrado inflamatório. **Conclusão:** O comprimento de onda vermelho alcançou desempenho superior em relação ao infravermelho.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Terapia Laser de Baixa Intensidade; Transplante de Pele; Necrose; Reparação Tecidual.

4.2.1 Introdução

Os enxertos de pele de espessura total consistem em um segmento de pele sadio, com epiderme e derme da área doadora, transferido para uma região corporal danificada (Hierner *et al.*, 2005; Carvalho, 2015). Para que ocorra uma integração adequada do tecido, é necessário o restabelecimento do suprimento sanguíneo (Alexandre *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2020). Contudo, frequentemente a prática clínica depara-se com diversas complicações no processo de integração do enxerto, sendo a necrose a principal causa de perda do procedimento (Gonçalves *et al.*, 2007; Martignago *et al.*, 2019).

Então, faz-se necessário implementar tratamentos de baixo custo e alta aplicabilidade capazes de otimizar a integração da pele enxertada. A terapia por fotobiomodulação (FBM) apresenta-se como um recurso promissor, dado que seus efeitos sobre a reparação tecidual e modulação da inflamação são muito evidenciados na literatura (Sobranko; Alster, 2008; da Silva *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2017). Entretanto, o uso da FBM para auxiliar na integração de enxerto de pele ainda é pouco explorado, tanto na prática clínica quanto em estudos experimentais (da Silva *et al.*, 2013; Dahmardehei *et al.*, 2016; Reis Filho *et al.*, 2017; Kazemikhoo *et al.*, 2018; Martignago *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2020).

Diante dos poucos estudos que utilizam a FBM no pós-cirúrgico de enxertos, ressalta-se que nenhum deles implementou essa terapia no período intraoperatório. Posto que a aplicação da FBM na área receptora, ou seja, antes da colocação do tecido, pode promover estímulos à microcirculação local que servirá de suporte para receber o enxerto. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da FBM laser na área receptora, comparando dois comprimentos de onda, para otimizar a integração de enxertos de pele total, em ratos.

4.2.2 Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - CEUA nº 1689070519). Todos os procedimentos cirúrgicos e de manejo dos animais foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de ética e experimentação animal (National Research Council, 1996).

Animais e procedimento experimental

Um total de 36 ratos machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia Mammalia*) da linhagem Wistar, com massa corporal entre 350-400 gramas, foram mantidos em gaiolas individuais, com condições controladas de temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$), luz (ciclo claro-escuro de 12/12 horas) e livre acesso a alimento e água.

Os animais tiveram sua massa corporal aferida e foram anestesiados via intraperitoneal, com associação de Acepromazina (2,5 mg/kg), Ketamina (75 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg), utilizando uma seringa de insulina. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral para tricotomia digital da região dorsal, e logo após foram demarcados com o auxílio de uma régua nas dimensões de 5 cm de comprimento e 3 cm de largura.

Então, o fragmento de pele foi retirado e o músculo panículo carnoso foi dissecado da derme, no intuito de simular o enxerto de pele de espessura total (Richter *et al.*, 2006 e 2009). Para evitar a inosculação vascular, o tecido cutâneo foi rotacionado em 180° e recolocado no leito com suturas a 1 cm de distância, e uma sutura central foi acrescentada para evitar bolhas e/ou deslocamento do enxerto (Martignago *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2020) (figura 3). No final do procedimento cirúrgico, os animais receberam Tramadol (20 mg/kg) via intramuscular e sua administração continuou por mais dois dias.

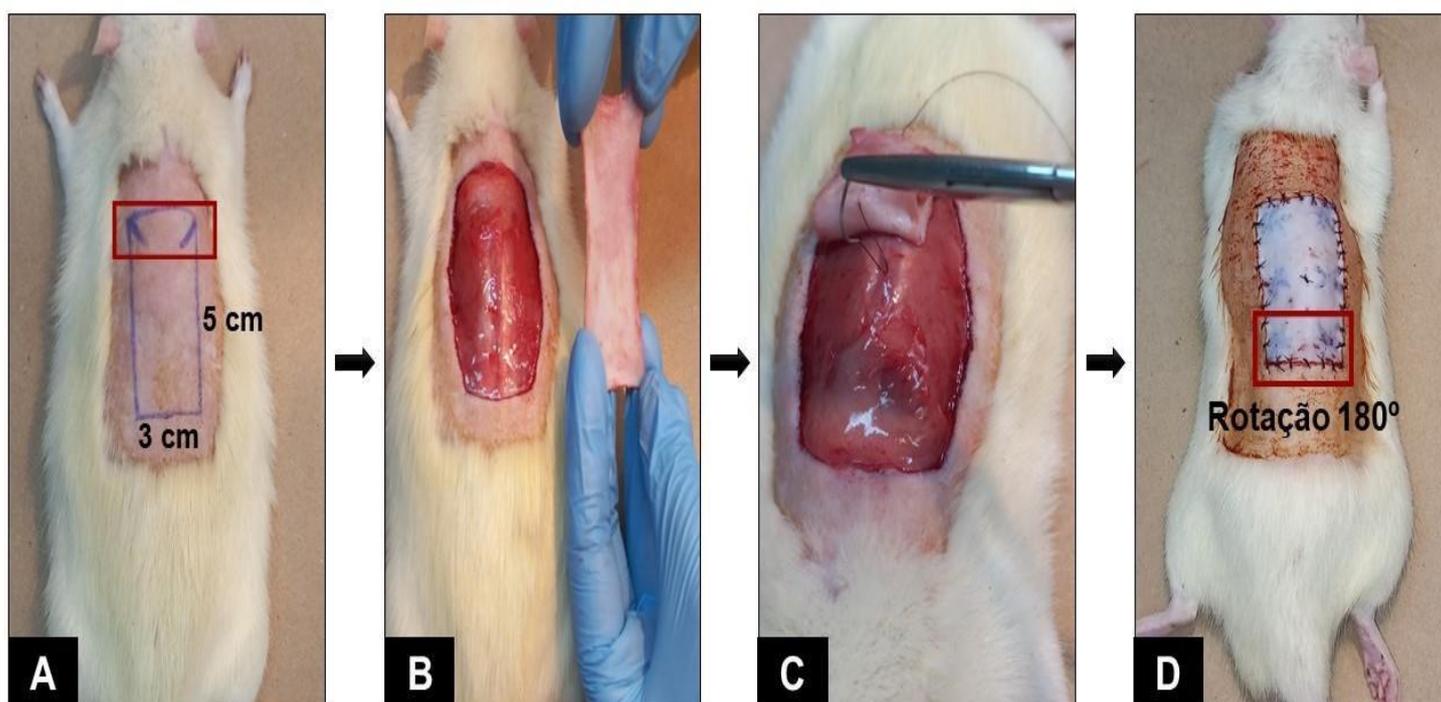


Figura 3 - Fotos representativas da técnica cirúrgica. **A.** Animal com o dorso tricotomizado e demarcado para o enxerto, com dimensão de 5x3 cm; **B.** Dissecção do músculo panículo carnoso; **C.** Ponto central para estabilizar o enxerto; **D.** Processo de fechamento, com ponto simples.

Grupos experimentais e fotobiomodulação laser

Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos experimentais, com 12 animais cada: grupo controle (GC), grupo área receptora vermelho (ARV) e grupo área receptora infravermelho (ARI). Todos os grupos foram submetidos ao procedimento de enxerto de pele total, mas apenas o GC não recebeu tratamento, e os demais foram tratados com FBM laser na área receptora, ou seja, antes da colocação do enxerto (figura 4).

A irradiação com a FBM laser foi realizada nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm), com a mesma parametrização: potência de 100 mW, fluência de 25 J/cm² por ponto, energia total de 6 J, e os demais parâmetros estão descritos na tabela 3. A aplicação foi realizada na forma de contato, perpendicular ao local, por meio do equipamento Therapy XT, DMC, São Carlos/SP, Brasil.

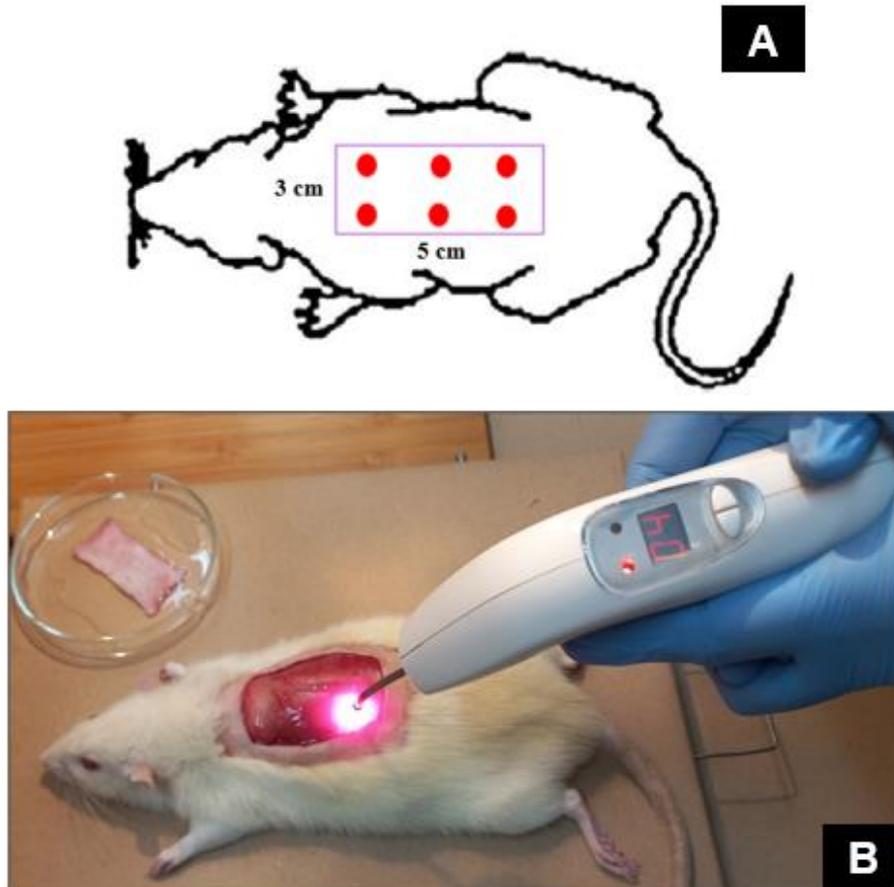


Figura 4 - Representação da aplicação da FBM na área receptora. **A.** Demonstração dos 6 pontos de irradiação, ao longo da área receptora; **B.** Irradiação da área receptora, com o enxerto de pele imerso em solução salina para ser implementado após a bioestimulação do leito.

Tabela 3. Parâmetros da FBM laser

Parâmetros	
Área do feixe	0,04 cm ²
Potência	100 mW
Irradiância	2.500 mW/cm ²
Fluência	25 J/cm ²
Tempo de irradiação	10 s
Energia por ponto	1 J
Número de pontos irradiados	6 pontos

Eutanásia e análises biológicas

A eutanásia ocorreu por decapitação nos 3^o e 7^o dias após o procedimento. Em cada período, foram mortos 6 animais por grupo (Damy *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2017) para as análises clínico-fotográfica e histológica.

Imagens foram capturadas por uma câmera digital acoplada em um tripé a 20 cm de distância do dorso do animal, para avaliação macroscópica da necrose. Foi utilizado o *software Image J®*, versão 1.3.1 (NHI, Estados Unidos), no qual toda a área do enxerto foi demarcada, seguido pelo delineamento de cada área necrótica. A porcentagem de necrose foi calculada pela somatória das áreas de necrose (em pixels), dividido pela área total do enxerto (em pixels), multiplicado por 100 (Tim *et al.*, 2018).

Para a análise histológica, foram retiradas amostras do tecido em uma região de transição, composta por uma parte da pele saudável e uma parte do enxerto sem necrose visível. Essas amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha), emblocadas em paraplast e cortadas de modo longitudinal com 5 µm de espessura. Foram obtidos três cortes de cada amostra, corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck), e posteriormente dois avaliadores cegos analisaram 3 campos de cada amostra. Através de um microscópio de luz (Olympus, OpticalCo. Ltd, Tokyo, Japan) com objetiva de 4x, descreveu-se sobre os seguintes aspectos morfológicos: infiltrado inflamatório e fibrose (Brassolatti *et al.*, 2018).

Análises estatística e qualitativa descritiva

Os dados quantitativos foram submetidos aos testes de Levene e de Shapiro-Wilk, para verificar a homogeneidade e a normalidade, respectivamente. Para os dados de necrose macroscópica, foi utilizado o teste ANOVA - *Two Way* com *post hoc* de Tukey. Em todas as análises, foi considerado nível de significância de 5%.

Em relação aos dados histopatológicos, foi utilizada análise qualitativa descritiva fundamentada em uma avaliação semiquantitativa, pontuando as características morfológicas dentro de uma escala de 0 a 3 (0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = intenso) (Otterço *et al.*, 2018).

4.2.3 Resultados

A avaliação macroscópica da necrose identificou que o GC apresentou média de 21,94% no 3º dia e 26,30% no 7º dia. Já o grupo ARV obteve média de 14,50% no 3º dia e 16,01% no 7º dia, enquanto o grupo ARI atingiu média de 15,03% no 3º dia e 37,29% no 7º dia.

O grupo ARV exibiu os menores percentuais médios de necrose tecidual, mas sem diferença estatística significativa em relação ao GC nos dois períodos avaliados. No grupo ARI também não foram encontradas diferenças estatísticas significantes em relação ao GC; contudo, nota-se média similar entre os grupos ARI e ARV no 3º dia, seguido por um aumento expressivo da necrose no 7º dia do grupo ARI. Assim, tem-se significância estatística entre os grupos ARV e ARI no 7º dia ($p = 0.0022$), e entre os dois períodos do grupo ARI ($p = 0.0044$).

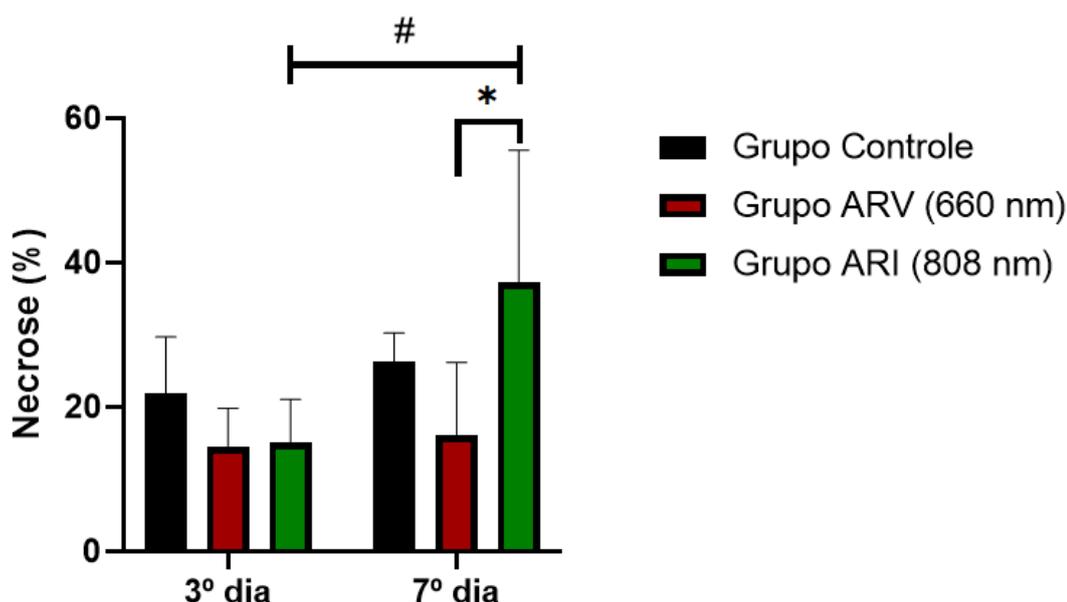


Figura 5 - Média e desvio padrão dos percentuais de necrose dos diferentes grupos, nos dois períodos avaliados. (*) $p = 0.0022$; (#) $p = 0.0044$

Na análise histológica, o GC e o grupo ARV apresentaram leve infiltrado inflamatório nos dois períodos, enquanto a fibrose melhorou de moderada no dia 3 para leve no dia 7. Em contrapartida, o grupo ARI expõe uma progressão não satisfatória tanto da fibrose quanto do infiltrado inflamatório, dado que a fibrose passou de moderada no dia 3 para intensa no dia 7, e o infiltrado inflamatório foi de leve no dia 3 para intenso no dia 7 (figura 6).

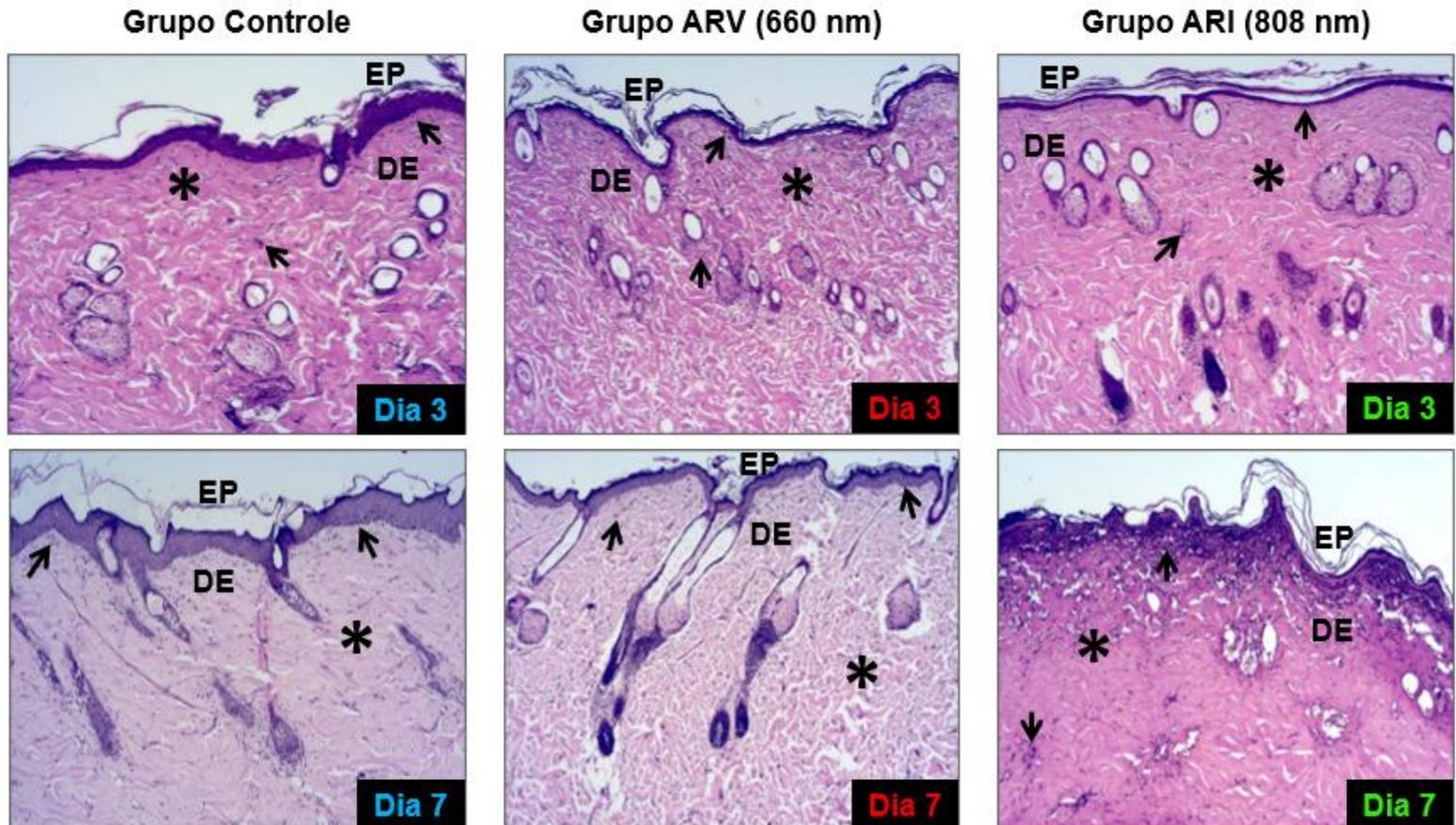


Figura 6 - Fotomicrografias representativas dos grupos, coradas com hematoxilina e eosina. (EP) epiderme; (DE) derme; (*) fibrose; (seta) infiltrado inflamatório

4.2.4 Discussão

Os principais achados deste estudo indicam resultados mais promissores após a bioestimulação da área receptora com a FBM laser vermelha (660 nm), quando comparado a FBM laser infravermelha (808 nm). O grupo ARV obteve as menores porcentagens de necrose e melhores características morfológicas em relação ao ARI, que apresentou complicações nos períodos avaliados.

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos da FBM em enxertos de pele comparando os comprimentos de onda vermelho (630 nm) e infravermelho (850 nm), em ratos, porém via diodo emissor de luz (LED). Martignago *et al.* (2019) utilizaram fluência de 6 J/cm² e irradiância de 0.4 W/cm², com um tempo de irradiação de 15 s e aplicação diária da terapia, totalizando 10 aplicações. A melhora na integração do enxerto foi obtida com o comprimento de onda vermelho, a qual foi justificada pelos autores mediante o estímulo à expressão do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), gerado por esse comprimento de onda, que estimula a formação de fibroblastos, e sendo algo não observado no grupo

infravermelho. Tais achados corroboram com os deste estudo, dado que uma única aplicação com o laser 660 nm na área receptora atingiu resultados melhores, quando comparado ao laser 808 nm.

Similarmente, de Souza *et al.* (2019) compararam a FBM laser nos comprimentos de onda 660 nm e 830 nm na integração de enxerto de pele, em ratos, porém avaliando os efeitos do uso ou não de nicotina. Nesse, a aplicação da FBM foi realizada no 3º dia após retirada de curativo e por mais 7 dias, com fluência de 10 J/cm², irradiância de 1.07 W/cm² e tempo de irradiação de 9,34 s. Tal como em nossos achados, foi observado infiltrado inflamatório leve no grupo 660 nm sem uso de nicotina, destacando assim os benefícios da aplicação única na área receptora com o laser 660 nm.

Em contrapartida, o estudo de de Souza *et al.* (2019) também observou leve infiltrado inflamatório no grupo 830 nm sem o uso de nicotina, contrastando com os resultados encontrados neste estudo. Ao equiparar nosso tratamento com o de de Souza *et al.* (2019), ficam evidentes diversos fatores que podem ser explorados em estudos futuros, como: a relação da profundidade do comprimento de onda infravermelho na área receptora; quantidade de aplicações da FBM e adequação da parametrização do laser 808 nm para a área receptora. Assim, nosso estudo tende a ser um ponto de partida, para melhor caracterizar o uso da FBM aplicada na área receptora, visando a integração de enxerto de pele.

Por outro lado, Castro *et al.* (2020) investigaram a FBM laser somente no comprimento de onda vermelho (660 nm) na integração do enxerto de pele, em ratos. Foi aplicada energia de 2.4 J por ponto em 12 pontos, irradiância de 1 mW/cm² e tempo de 60 s, com irradiação imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada 24 h, totalizando 7 aplicações. Mutuamente, Moreira *et al.* (2020) estudaram o laser 660 nm em enxerto de pele, em ratos, mas em diferentes periodicidades. O período experimental foi de 15 dias, no qual um grupo foi tratado a cada 3 dias, enquanto outro grupo a cada 5 dias; ainda, foram investigadas as fluências de 6 J/cm² por 12 s, e de 10 J/cm² por 20 s. Apesar das diferenças de protocolos e ressaltando que a energia utilizada por Castro *et al.* (2020) foi consideravelmente maior do que a utilizada em nosso estudo, ambos os autores relataram resultados positivos perante o controle da inflamação e presença de melhores condições teciduais, corroborando com o nosso estudo no que tange a FBM vermelha.

Ademais, Kazemikhoo *et al.* (2018) investigaram o uso do laser aplicado durante 7 dias, em pacientes que realizaram o enxerto de pele após queimaduras. Foram utilizados dois comprimentos de onda, o 650 nm com fluência de 2 J/cm² e irradiância de 0.6 W/cm² no enxerto, e o comprimento de onda de 808 nm com fluência de 6 J/cm² nas margens da ferida. A associação desses dois comprimentos de onda reduziu a taxa de deiscência no grupo irradiado, além de evidenciar que o tratamento com FBM em enxerto de pele é promissor para a prática clínica.

Então, ao analisar os estudos disponíveis na literatura, observa-se que todos realizaram mais de uma aplicação da FBM, dando continuidade à terapia no período pós-operatório e com seu prolongamento por pelo menos 7 dias. Nosso estudo, por sua vez, apresentou apenas a aplicação no período intraoperatório, e obteve resultados similares no que tange ao menor percentual necrótico e melhores características histopatológicas no grupo tratado com laser 660 nm. Tais achados predizem que apenas uma aplicação com laser vermelho na área receptora é capaz de estimular fatores teciduais para otimizar a integração do enxerto; no entanto, é necessário investigar novas parametrizações para ampliar essa abordagem terapêutica, levantando importantes questões científicas a serem respondidas ao longo do tempo até o estabelecimento deste protocolo na área clínica.

Cabe ainda reforçar que, como não foram encontradas diferenças expressivas entre os grupos laser e controle, alguns fatores podem ser hipotetizados. Uma possível explicação refere-se à quantidade de energia aplicada no leito, que pode não ter sido suficiente em aplicação única para reduzir significativamente a necrose e promover maior integração do enxerto. Devido a isso, sugere-se em pesquisas futuras a investigação de maiores energias na preparação da área do enxerto, com ressalva também para o número de pontos irradiados, uma vez que este é o primeiro protocolo proposto para bioestimular o leito antes de enxertar a pele.

Nessa mesma temática, os autores citados utilizaram irradiâncias menores (Martignago *et al.*, 2019 - irradiância: 0.4 W/cm²; de Souza *et al.*, 2019 - irradiância: 1.07 W/cm²; Castro *et al.*, 2020 - irradiância: 1 W/cm²; Moreira *et al.*, 2020 - irradiâncias: 0.5 W/cm²) do que a aplicada em nosso estudo (2.5 W/cm²), trazendo os resultados de múltiplos estímulos. Essa equiparação tende a ser delicada, pois nosso estudo é o pioneiro até o presente momento que traz um estímulo aplicado na área receptora. Todavia, também hipotetiza-se associar as duas metodologias para otimizar a integração de enxerto de pele, sendo o tratamento intraoperatório seguido

por sua continuidade no pós-cirúrgico, que novamente refletirá na parametrização da FBM.

Logo, é possível observar que os parâmetros são muito divergentes entre os estudos, além da literatura ser muito escassa nesta temática, o que dificulta a escolha para a prática clínica, mas expõe um amplo caminho a ser explorado. Por fim, destaca-se o caráter inovador deste estudo ao aplicar a FBM na área receptora para otimizar a integração do enxerto de pele, atuando como um importante norteador para futuros estudos que busquem diferentes investigações acerca da utilização desse recurso terapêutico.

4.2.5 Conclusão

Há um grande potencial para a utilização da FBM na área receptora, principalmente no comprimento de onda vermelho que promoveu aumento na viabilidade do enxerto de pele total.

4.3 ESTUDO *IN VIVO*: Fotobiomodulação no Tratamento Pós-Cirúrgico

Comparação entre dois comprimentos de onda da fotobiomodulação laser na modulação inflamatória e viabilidade de enxertos de pele total, em ratos

Maria Carolina Derencio Oliveira¹, Patricia Brassolatti², Lara Maria Bataglia Espósito¹, Luis Henrique Oliveira de Moraes³, Camila Pereira Sabadini³, Krissia Franco de Godoy⁴, Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte⁵, Fernanda de Freitas Anibal⁴; Richard Eloin Liebano^{1,6}

¹ Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

² Departamento de pesquisa, desenvolvimento e inovação, Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos (IBRAMED), Amparo - SP, Brasil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁴ Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁵ Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos / SP, Brasil.

⁶ Department of Rehabilitation Sciences, University of Hartford, West Hartford, CT, Estados Unidos.

RESUMO

Objetivo: Investigar os efeitos de um protocolo de tratamento com fotobiomodulação (FBM) laser no pós-operatório de enxerto de pele total, em ratos. **Métodos:** Foram randomizados 36 ratos Wistar em três grupos: controle (GC), tratamento 660 nm (TV) e tratamento 808 nm (TI). Foi retirado um segmento de pele de 5x3 cm e o panículo carnoso foi removido. Após rotação de 180°, o enxerto foi reposicionado sobre a área doadora. Os grupos TV e TI receberam FBM no pós-operatório imediato e por mais dois dias consecutivos, com energia de 1 J por ponto em 6 pontos. Capturas fotográficas, amostras teciduais e soro sanguíneo foram coletados nos dias 3 e 7 após o procedimento. Foram utilizados os testes estatísticos Anova-Two way com post hoc de Tukey, Kruskal Wallis e Friedman com *post hoc* de Dunn. **Resultados:** Nos períodos avaliados, o grupo TV desenvolveu necrose significativa tanto em relação ao GC quanto ao TI, e houve progressão relevante no grupo TI. As características histológicas apontaram infiltrado inflamatório intenso e fibrose de moderada para intensa no grupo TV, e ambos passaram de leve para moderado no grupo TI. A expressão das citocinas TNF- α e IL-6 aumentaram de forma considerável no grupo TI. **Conclusão:** Nos parâmetros investigados, o comprimento de onda infravermelho demonstrou melhor desempenho comparado ao vermelho.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Enxerto de Pele; Tratamento Pós-Cirúrgico; Terapia Laser de Baixa Intensidade.

4.3.1 Introdução

A técnica de enxertia cutânea é muito utilizada na cirurgia plástica reparadora (Andreassi *et al.*, 2005), mas está sujeita a vários desfechos adversos como necrose, seroma, hematoma, movimentos de cisalhamento, dentre outros (Mcgregor; Mcgregor, 1995; Alves; Corrêa; Liebano, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Stanley *et al.*, 2013). Para evitar esses desfechos e maximizar os resultados estéticos e funcionais, é preciso potencializar o processo de cicatrização estimulando a neovascularização, proliferação celular, síntese proteica, além de modular a inflamação (Fujino *et al.*, 1986; Kiyozumi, 1988; Sobanko *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009; Kazemikhoo *et al.*, 2018).

Todos esses benefícios celulares e moleculares podem ser alcançados mediante o uso da fotobiomodulação (FBM) laser, um recurso fisioterapêutico presente no tratamento de variados tipos de feridas cutâneas (de Moraes, 2018). Porém, a FBM é pouco investigada como terapia pós-cirúrgica para enxertos de pele (da Silva *et al.*, 2013; Dahmardehei *et al.*, 2016; Reis Filho *et al.*, 2017; Kazemikhoo *et al.*, 2018; Martignago *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2020), evidenciando assim uma lacuna expressiva sobre os efeitos fotobiomodulares decorrentes da adequada parametrização do laser no auxílio à integração de enxertos.

À vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a ação da FBM laser nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, quantificando macroscopicamente a necrose tecidual e a expressão de três citocinas inflamatórias, como também a qualidade da fibrose e do infiltrado inflamatório do tecido enxertado.

4.3.2 Métodos

Todos os procedimentos deste estudo foram executados seguindo o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, assim como as normas internacionais de ética e experimentação animal (National Research Council, 1996). O estudo foi protocolado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - CEUA nº 1689070519).

Animais e procedimento cirúrgico experimental

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia Mammalia*) da linhagem Wistar, com massa corporal entre 350-400 gramas. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso a água e ração, e

temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$) e luz (ciclo claro-escuro de 12/12 horas) controlados.

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com a combinação de Acepromazina (2,5 mg/kg), Ketamina (75 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg), de acordo com a massa corporal de cada um e com o auxílio de seringas de insulina. Após, foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos quatro membros, para a realização da tricotomia digital dorso e sua marcação, formando um retângulo nas dimensões de 5 cm de comprimento e 3 cm de largura.

Na sequência, o fragmento de pele foi retirado e o panículo carnososo foi separado da derme para mimetizar o enxerto de pele de espessura total (Richter *et al.*, 2006 e 2009). Visando impedir a inosculação vascular, o enxerto foi rotacionado em 180° , suturado em seu leito com pontos a 1 cm de distância, e um ponto central foi adicionado como precaução ao deslocamento do tecido e/ou formação de bolhas (Martignago *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2020) (figura 7). Os animais receberam Tramadol (20 mg/kg) via intramuscular logo após o fim do procedimento cirúrgico e por mais dois dias consecutivos.

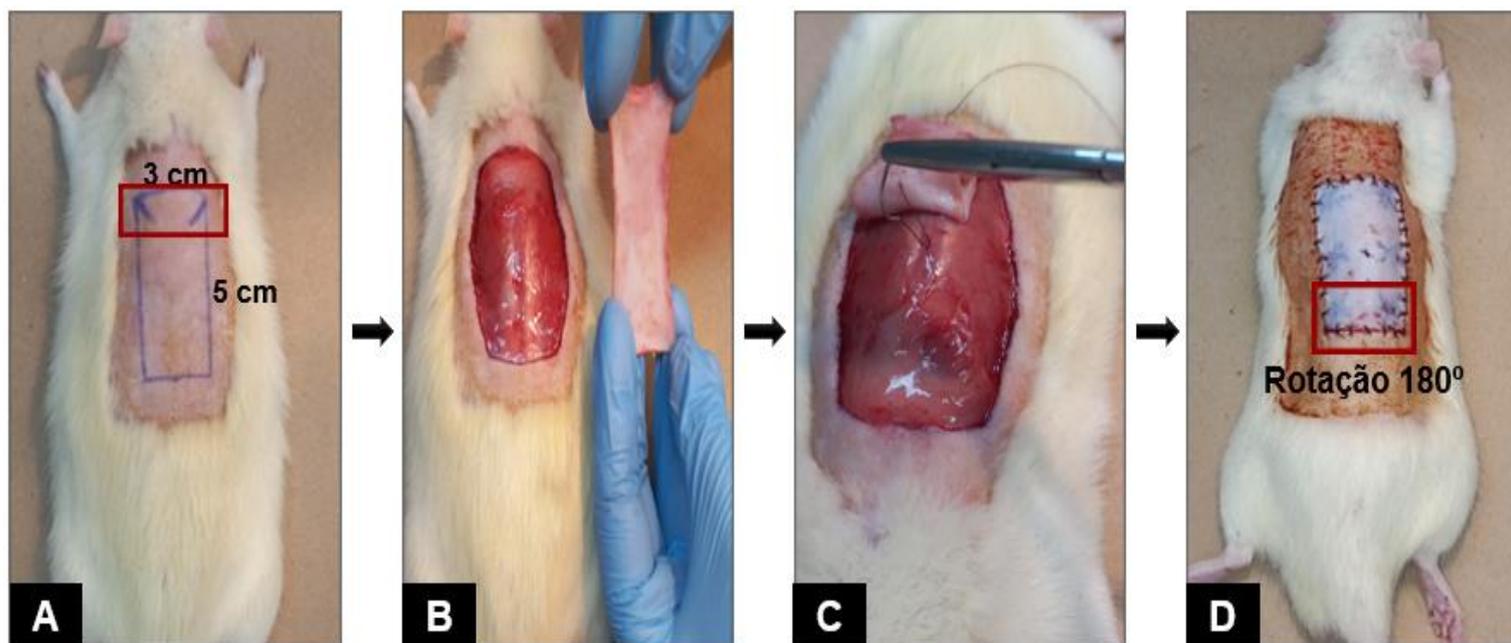


Figura 7 - Fotos representativas do procedimento cirúrgico. **A.** Animal com o dorso tricotomizado e demarcado para o enxerto (dimensão: 5x3 cm); **B.** Enxerto sem o músculo panículo carnososo; **C.** Inserção do ponto central para estabilização do enxerto; **D.** Enxerto suturado, com demarcações para aplicação da FBM laser.

Grupos experimentais e fotobiomodulação

Os animais foram divididos randomicamente em três grupos experimentais: grupo controle (GC), grupo tratamento vermelho (TV) e grupo tratamento infravermelho (TI). Cada grupo foi composto por 12 animais, e todos passaram pelo procedimento cirúrgico de enxerto de pele total. Dos três grupos, somente o GC não recebeu aplicação de FBM, enquanto os grupos TV e TI foram irradiados imediatamente após a cirurgia e por mais dois dias consecutivos, totalizando assim três aplicações com a FBM (figura 8).

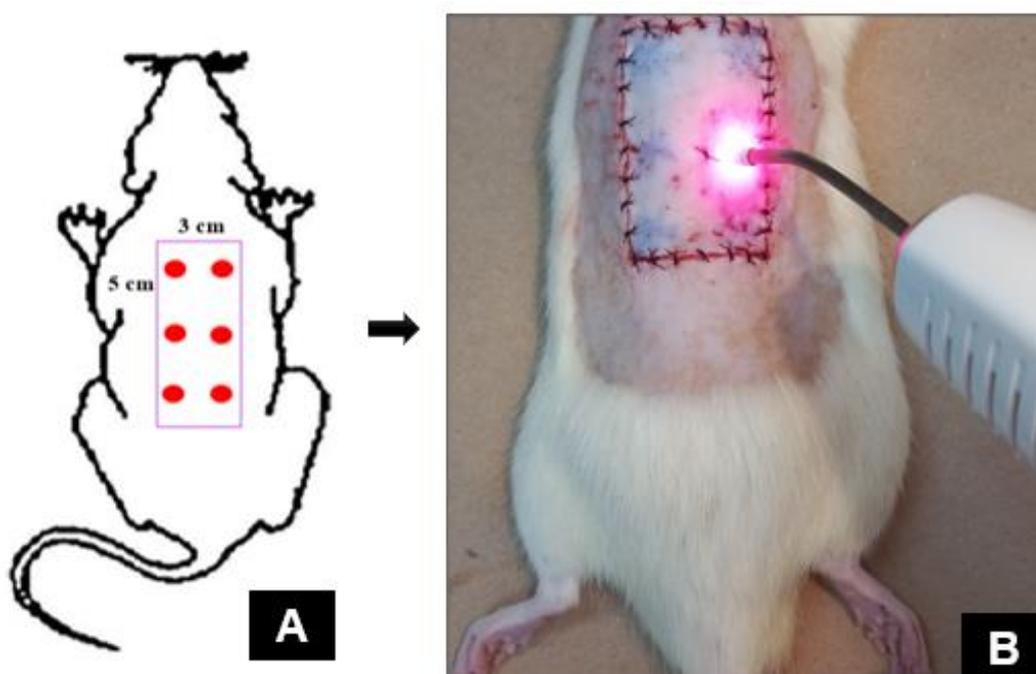


Figura 8 - Representação do tratamento pós-operatório com FBM laser. **A.** Posicionamento dos 6 pontos irradiados; **B.** Aplicação da FBM nos respectivos pontos pré-determinados.

Para o tratamento com FBM laser, foi utilizado o equipamento Therapy XT, DMC, São Carlos/SP, Brasil, nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm). As irradiações foram realizadas no modo de contato, perpendicular ao local, e os parâmetros empregados foram fixos para os dois comprimentos de onda (tabela 4).

A eutanásia dos animais aconteceu nos 3^o e 7^o dias pós-operatórios, através da decapitação, e 6 animais por grupo foram submetidos à eutanásia em cada período (Damy *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2017).

Tabela 4. Parametrização da FBM laser utilizada em cada aplicação.

Parâmetros	
Área do feixe (cm²)	0,04
Potência (mW)	100
Irradiância (mW/cm²)	2.500
Fluência (J/cm²)	25
Tempo de irradiação (s)	10
Energia por ponto (J)	1
Número de pontos irradiados	6
Energia total (J)	6

Análise macroscópica da necrose

Com o auxílio de uma câmera digital posicionada em um tripé a 20 cm de distância da região dorsal dos animais, imagens foram registradas e analisadas no *software Image J®*, versão 1.3.1 (NHI, Estados Unidos). Primeiramente, toda a área do enxerto foi delimitada e obteve-se seu valor em pixels; em seguida, todas as áreas de necrose tecidual também foram delimitadas e os respectivos valores em pixels foram somados. Para determinar a porcentagem de necrose de cada animal, calculou-se a razão entre a somatória das áreas necróticas pela área total do enxerto, e esse resultado foi multiplicado por 100 (Tim *et al.*, 2018).

Análise histológica

As amostras teciduais foram retiradas de regiões que, visíveis a olho nu, indicavam não possuírem necrose. Essas foram denominadas neste estudo como região de transição, que compreende uma parte do enxerto sem tecido necrótico e uma parte do tecido saudável. Posto isso, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido pelo emblocamento em paraplast e cortes longitudinais desses blocos com 5 µm de espessura.

Cada lâmina foi composta por três cortes das respectivas amostras, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck). Por intermédio de um microscópio de luz (Olympus, OpticalCo. Ltd, Tokyo, Japan) em magnitude de 4x, dois

avaliadores cegos ao estudo descreveram qualitativamente sobre a presença de infiltrado inflamatório e fibrose, a partir da análise de 3 campos de cada lâmina. Para as descrições qualitativas, utilizou-se como base uma avaliação semiquantitativa, que pontua em uma escala de 0 a 3 (0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = intenso) (Brassolatti *et al.*, 2018; Otterço *et al.*, 2018).

Quantificação de citocinas inflamatórias

As citocinas fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) foram mensuradas via ensaio imunoenzimático. Após a centrifugação do sangue dos animais, o soro oriundo foi aliquoteado em microtubo e congelado a -80°C . Kits Mouse TNF- α , IL-6 e IL-10 ELISA Set (BD Biosciences®, Minnesota, EUA) foram empregados, de acordo com as orientações do fabricante, e os dados da quantificação da absorbância foram obtidos por um leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific®) em 450 nm de comprimento de onda.

Análise estatística

Os testes de Shapiro-Wilk e de Levene foram aplicados nos dados quantitativos para verificar suas normalidade e homogeneidade, respectivamente. O teste ANOVA - *Two Way* com *post hoc* de Tukey foi utilizado nos dados da necrose macroscópica e da citocina IL-10. Os testes Kruskal Wallis e Friedman, ambos com *post hoc* de Dunn, foram utilizados nos dados das citocinas TNF- α e IL-6 para as comparações intergrupos e intragrupos, mutuamente. Foram consideradas as diferenças estatísticas de 5% como significativas.

4.3.3 Resultados

A análise clínico-fotográfica verificou os seguintes percentuais médios de necrose: 21,94% no 3º dia e 26,30% no 7º dia do GC; 46,50% no 3º dia e 58,08% no 7º dia do grupo TV; 17,06% no 3º dia e 39,54% no 7º dia do grupo TI.

O grupo TV apresentou as maiores porcentagens médias, com significância estatística tanto em relação ao GC quanto ao grupo TI nos dois períodos avaliados. Já no grupo TI, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas quando comparado com o GC, mas dentre os seus 3º e 7º dias, houve um acréscimo considerável de necrose e consequente diferença estatística.

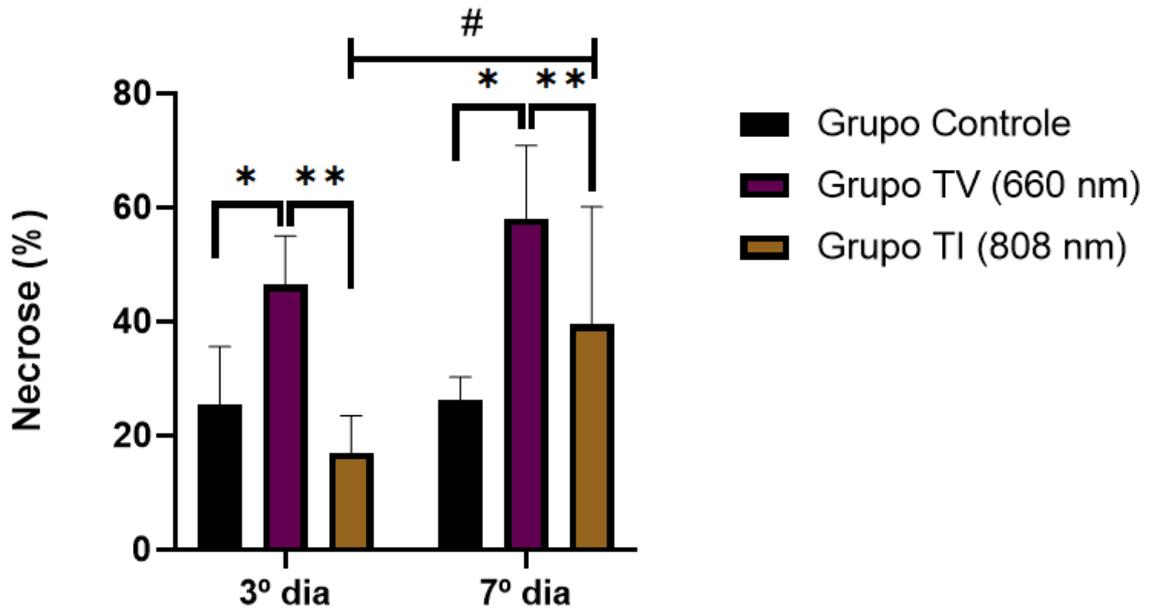


Figura 9 - Média e desvio padrão das porcentagens de necrose dos diferentes grupos, nos dois períodos avaliados. $p < 0.05$: (*) grupo controle x grupo 660 nm ;(**) grupo 660 nm x grupo 808 nm; (#) intragrupo 808 nm

As características histológicas do GC demonstram fibrose moderada no dia 3 e leve no dia 7, com infiltrado inflamatório leve nos dois períodos. No grupo TI, tanto a fibrose quanto o infiltrado inflamatório passaram de leve no dia 3 para moderado no dia 7. Em contraparte, o grupo TV apresentou características inferiores aos demais grupos, com fibrose moderada no dia 3 e intensa no dia 7, e infiltrado inflamatório intenso nos dois dias avaliados (figura 10).

A respeito da expressão das citocinas inflamatórias, não foram identificadas significâncias estatísticas na citocina IL-10. Já nas citocinas TNF- α e IL-6, foi verificado um aumento na expressão de ambas no grupo TI, quando comparadas nos dois períodos desse grupo ($p = 0.0017$ e $p = 0.0003$, respectivamente).

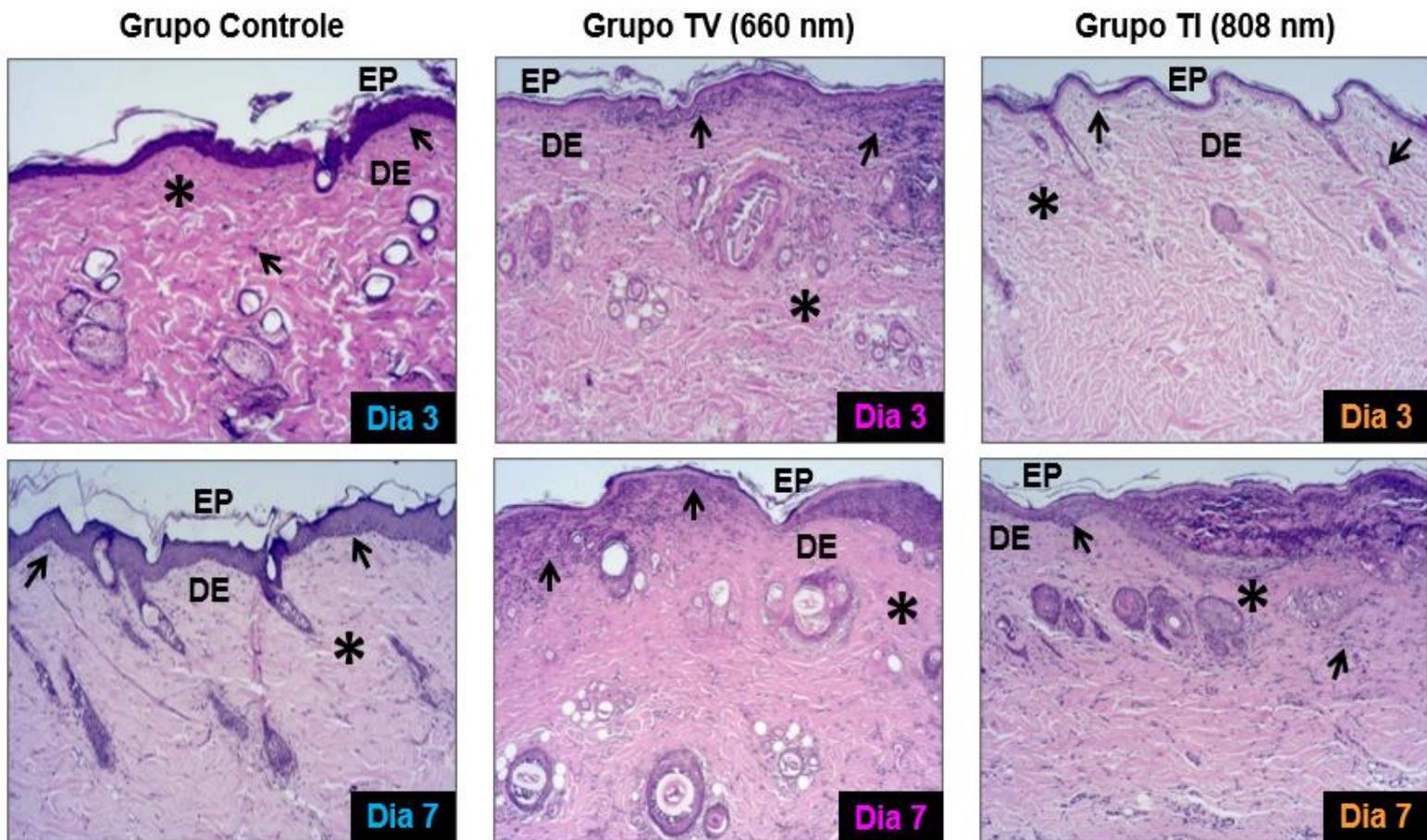


Figura 10 - Representação em fotomicrografias dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, dos grupos investigados. (EP) epiderme; (DE) derme; (*) fibrose; (seta) infiltrado inflamatório

4.3.4 Discussão

O propósito deste estudo foi investigar e comparar a ação da FBM laser em comprimentos de onda distintos, no tratamento pós-cirúrgico de enxerto de pele total, em ratos. Observou-se resultados promissores no grupo TI, visto que o TV foi o grupo que mais obteve necrose nos dois períodos avaliados e características histológicas graves. Todavia, após a retirada do tratamento, o percentual de necrose aumentou no grupo TI entre os dias analisados, com modificações morfológicas menos intensas e detecção das citocinas TNF- α e IL-6.

Os comprimentos de onda da FBM laser mais citados na literatura são o vermelho e o infravermelho (Chung *et al.*, 2012), principalmente no que tange a profundidade tecidual alcançada, sendo que o vermelho atua mais superficialmente e o infravermelho em tecidos mais profundos (Karu, 2010). Entretanto, atualmente o uso do infravermelho vem sendo explorado para tratar lesões em tecidos mais superficiais,

como a pele (Fathabadie *et al.*, 2013), e por isso a comparação desses comprimentos de onda no reparo tecidual busca entender qual a maior contribuição de cada luz.

De Souza *et al.* (2019) contrastaram a FBM laser de 660 nm com a de 830 nm na integração de enxerto de pele, em ratos. O tratamento foi iniciado no 3º dia pós-operatório e finalizado após sete dias consecutivos, com fluência de 10 J/cm², irradiância de 1.07 W/cm², energia total de 3.64 J e os autores encontraram menor extensão do infiltrado inflamatório nos dois grupos. A dosimetria aplicada em nosso estudo corrobora com os achados de de Souza *et al.* (2019) apenas em relação ao grupo tratado com infravermelho, divergindo do grupo laser 660 nm que apresentou intenso infiltrado inflamatório nos dois períodos avaliados.

Martignago *et al.* (2019) também compararam os dois comprimentos de onda em enxerto de pele, em ratos, mas com a FBM diodo emissor de luz (LED). Com fluência de 6 J/cm², irradiância de 0,4 W/cm², energia total de 45 J, os autores identificaram melhor organização do colágeno no grupo LED 660nm, quando comparado ao grupo LED 850 nm. Inversamente, o nosso estudo expõe fibrose moderada no 3º dia e intensa no 7º dia no grupo tratado com laser 660 nm, enquanto o tratado com laser 808 nm apresentou colágeno mais organizado.

Perante os estudos que, assim como o nosso, fixaram os parâmetros para comparar os dois comprimentos de onda, observa-se que a FBM laser vermelha não proporcionou boas condições morfológicas apenas em nosso estudo. Uma das hipóteses que pode explicar essa disparidade consiste no número de pontos irradiados, associado ao tamanho do enxerto. Martignago *et al.* (2019) aplicaram o LED em 15 pontos no enxerto com as mesmas dimensões do nosso estudo; já de Souza *et al.* (2019) usaram o laser em 13 pontos no enxerto com dimensão de 2 x 2 cm.

Desse modo, a quantidade de pontos irradiados em nosso estudo pode não ter sido suficiente para o tamanho do enxerto, refletindo assim na baixa energia distribuída pelo enxerto tratado com laser 660 nm. No entanto, a mesma hipótese não foi observada no grupo tratado com laser 808 nm. Assim como de Souza *et al.* (2019) e diferentemente de Martignago *et al.* (2019), nosso estudo identificou fibrose e infiltrado inflamatório leves no 3º dia, com uma pequena modificação no 7º dia, reforçando que o comprimento de onda infravermelho parece tratar lesões em tecidos mais superficiais (Fathabadie *et al.*, 2013).

No que diz respeito às citocinas inflamatórias, a literatura é escassa em estudos *in vivo* que avaliem a ação da FBM na expressão do TNF- α e da IL-6, ainda mais correlacionando-as à viabilidade tecidual. Esteves *et al.* (2022) avaliaram duas energias (0,29 J e 7,30 J) do laser 660 nm no tratamento de retalho cutâneo aleatório, e verificou que a energia maior reduziu tanto a porcentagem de necrose quanto a expressão do TNF- α .

Taradaj *et al.* (2018) confrontaram três comprimentos de onda (658 nm, 808 nm e 940 nm) da FBM laser como tratamento clínico auxiliar em úlceras de pressão, aplicando fluência de 4 J/cm² uma vez ao dia, 5 vezes por semana durante 1 mês. Após coleta sanguínea dos voluntários, os autores detectaram redução expressiva na concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 nos pacientes que receberam a FBM vermelha.

Posto isso, no estudo em questão o tratamento em enxerto de pele com laser 660 nm, energia total de 6 J e fluência de 25 J/cm² não agiu na modulação das citocinas, além de atingir percentuais de necrose significativos em relação aos demais grupos, nos dois períodos avaliados. De forma complementar às condições morfológicas vistas nesse grupo, a energia empregada parece não ter sido suficiente.

No que se refere ao tratamento com laser 808 nm nos mesmos parâmetros, houve aumento significativo na expressão do TNF- α e da IL-6, assim como da porcentagem de necrose entre os períodos avaliados. Ao associar com as condições morfológicas desse grupo, indica-se que a FBM infravermelha estava agindo na modulação do processo inflamatório e regenerativo até o 3º dia, mas com o término do tratamento, a inflamação retornou e foi detectável no último período avaliado.

4.3.5 Conclusão

A FBM laser no comprimento de onda infravermelho e no protocolo investigado, foi capaz de modular a inflamação e aumentar a viabilidade do enxerto de pele total.

5. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com o estudo *in vitro*, foi possível verificar que há uma relação direta entre o tempo de irradiação e potência do laser. Ao determinar a quantidade de energia a ser utilizada, resultados mais promissores são alcançados quando se associa potências maiores com irradiações de curtos tempos.

Já com os estudos *in vivo*, a utilização da FBM laser na área receptora se mostrou promissora, com destaque para o comprimento de onda vermelho, que em aplicação única se equiparou a resultados encontrados na literatura, em estudos de tratamentos pós-cirúrgicos com múltiplas irradiações. De forma complementar, o protocolo investigado no pós-operatório realçou que o comprimento de onda infravermelho parece promover efeitos benéficos em tecidos superficiais, assim como a literatura atual começou a sugerir.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese demonstrou que, apesar da FBM laser ser uma abordagem terapêutica extensivamente explorada na literatura, seu completo mecanismo de ação ainda é indefinido e sua utilização no auxílio à integração de enxertos de pele é recente. Evidencia-se, portanto, a necessidade de estudos a nível de cultivo celular, experimentais e ensaios clínicos com o propósito de ampliar e aprofundar os conhecimentos sobre essa temática. A busca por protocolos eficazes refletirá tanto na prática clínica da fisioterapia dermatofuncional, quanto na recuperação dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, L. et al. A importância da fisioterapia nas técnicas de reconstrução cutânea - enxertos e retalhos. **Revista Fisioterapia Ser**, v. 2, n. 3, p. 183-187, 2007.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

ALVES, L. M.; CORRÊA, J. B.; LIEBANO, R. E. Agentes físicos na integração de enxertos de pele. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 201-208, 2009.

ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 332-337, 2005.

AUDRAIN, H.; BRAY, A.; DE BERKER, D. Full-thickness skin grafts for lower leg defects: an effective repair option. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 493-498, 2015.

AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52, 2013.

AYUK, S. M.; ABRAHAMSE, H.; HOURELD, N. Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 3, 2018.

BALDI, M. S.; AMARAL, A. B. Enxerto de pele. In: MÉLEGA, J. M. (org.). **Cirurgia plástica fundamentos e arte - princípios gerais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. p. 45-46.

BARBOZA, C. A. G.; GINANI, F.; SOARES, D. M.; HENRIQUES, A. C. G.; FREITAS, R. DE A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 1, p. 75-81, 2014.

BASSO, F. G. et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 4, p. 952-956, 2015.

BOSSINI, P. S. et al. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 2, p. 136-142, 2012.

BRASSOLATTI, P. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 4, p. 313-320, 2016.

BRASSOLATTI, P. et al. Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats. **Journal of Tissue Viability**, v. 27, n. 4, p. 249-256, 2018.

CARVALHO, A. F. R. Enxertos cutâneos – aplicações em cirurgia dermatológica. 2015. **Dissertação** (mestrado integrado em medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2015.

CASTRO, C. C.; MOTA, D. S. C.; SILVA, M. L. A. Enxertos cutâneos em cirurgia plástica. In: AVELAR, J. M. (org.). **Ensino da cirurgia plástica nas faculdades de medicina**. 1. ed. São Paulo: Hipócrates, 1994. p. 41-43.

CASTRO, T. N. S. et al. Effects of photobiomodulation therapy in the integration of skin graft in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 4, p. 939-947, 2020.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.-Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; DE FIGUEIREDO, L. F. P Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DAHMARDEHEI, M. 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 in Medical Science**, v. 31, n. 3, p. 497-502, 2016.

DA SILVA, E. B.; MANISCALCO, C. L.; ÉSPER, G. V. Z.; GUERRA, R. R.; KERPPERS, I. I. Macro and microscopic analysis of island skin grafts after low-level laser therapy. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 40, n. 1, p. 44-48, 2013.

DE ANDRADE, A. G.; DE LIMA, C. F.; DE ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21-30, 2010.

DE ANDRADE, A. L. M.; PARISI, J. R.; BRASSOLATTI, P.; PARIZOTTO, N. A. Alternative animal model for studies of total skin thickness burns. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 836-842, 2017.

DE ANDRADE, A. L. M. et al. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 4, p. 677-683, 2019.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.

DE SOUZA, T. R. et al. Photobiomodulation increases viability in full-thickness grafts in rats submitted to nicotine. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 52, n. 5, p. 449-455, 2019.

ENGEL, K. W.; KHAN, I.; ARANY, P. R. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. **Journal of Biophotonics**, v. 9, p. 1148-1156, 2016.

ESTEVEES, G. R. et al. Photobiomodulation effect in tumoral necrosis factor-alpha(TNF- α) on the viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 3, p. 1495-1501, 2022.

FÁVARO-PÍPI, E. et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 5, p. 311-317, 2011.

FATHABADIE, F. F.; BAYAT, M.; AMINI, A.; BAYAT, M.; REZAI, F. Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on mast cells number and degranulation in open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 15, n. 6, p. 294-304, 2013.

FERREIRA, M. C. et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

FUJINO, T.; KIYOIZUMI, T.; KUBOTA, J.; OHSHIRO, T. Clinical effect of diode laser to improve fair take of the grafted skin. **The Keio Journal of Medicine**, v. 35, n. 1, p. 28-35, 1986.

GEORGE, S.; HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 188, p. 60-68, 2018.

GONÇALVES, A. C. et al. Can therapeutic ultrasound influence the integration of skin grafts? **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 33, n. 9, p. 1406-1412, 2007.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, n. 2, p. 199-212, 2018.

HARORLI, O. T.; HATIPOGLU, M.; ERIN, N. Effect of photobiomodulation on secretion of IL-6 and IL-8 by human gingival fibroblasts in vitro. **Photobiomodulation, Photomedicine and Laser Surgery**, v. 37, n. 8, p. 457-464, 2019.

HARRISON, C. A.; MACNEIL, S. The mechanism of skin graft contraction: an update on current research and potential future therapies. **Burns**, v. 34, p. 153-163, 2008.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, p. 486-493, 2005.

HIERNER, R.; DEGREEF, H.; VRANCKX, J. J.; GARMYN, M.; MASSAGE, P.; VAN BRUSSEL, M. Skin grafting and wound healing - the "dermato-plastic team approach". **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 343-352, 2005.

HUANG, Y.-Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response**, v. 9, n. 4, p. 602-618, 2011.

ISHIDA, J.; SHIROMA, E. H. Enxertos compostos. In: MÉLEGA, J. M.; ZANINI, S. A.; PSILLAKIS, J. M. (org.). **Cirurgia plástica: reparadora e estética**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 43-48.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159-160, 2010.

KARU, T. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, n. 8, p. 607-610, 2010.

KAZEMIKHOO, N. et al. Evaluation of the effects of low level laser therapy on the healing process after skin graft surgery in burned patients (a randomized clinical trial). **Lasers in Medical Science**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2018.

KIM, H. P. Lightening up light therapy: activation of retrograde signaling pathway by photobiomodulation. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 491-496, 2014.

KIYOIZUMI, T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin and its photobiological mechanisms. **The Keio Journal of Medicine**, v. 37, n. 4, p. 415-428, 1988.

LOFÊGO FILHO, J. A. et al. Enxertia de pele em oncologia cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 465-472, 2006.

LUNA, G. L. F. et al. Biphasic dose/response of photobiomodulation therapy on culture of human fibroblasts. **Photobiomodulation, Photomedicine and Laser Surgery**, v. 38, n. 7, p. 413-418, 2020.

MALDANER, D. R. et al. In vitro effect of low-level laser therapy on the proliferative, apoptosis modulation, and oxi-inflammatory markers of premature-senescent hydrogen peroxide-induced dermal fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 7, p. 1333-1343, 2019.

MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 1, p. 157-164, 2019.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. Effect of laser rays on wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 122, n. 4, p. 532-535, 1971.

MIRALIAKBARI, R.; MACKAY, D. R. Skin grafts. **Journal Operative Techniques in General Surgery**, v. 8, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, S. H. et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 5, p. 1103-1109, 2020.

MCGREGOR, I. A.; MCGREGOR, A. D. Skin graft. In: _____ (org.). **Fundamental techniques of plastic surgery: and their surgical applications**. London: Churchill Livingstone, 1995. p. 35-59.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **National science education standards**. Washington, DC: National Academy Press, 1996.

OTTERÇO, A. N.; ANDRADE, A. L.; BRASSOLATTI, P.; PINTO, K. N. Z.; ARAÚJO, H. S. S.; PARIZOTTO, N. A. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 183, p. 22-29, 2018.

OTTERÇO, A. N.; BRASSOLATTI, P.; ANDRADE, A. L. M.; AVÓ, L. R. S.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Effect of photobiomodulation (670 nm) associated with vitamin A on the inflammatory phase of wound healing. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 9, p. 1867-1874, 2018.

PASSARELLA, S.; KARU, T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 344-358, 2014.

PIVA, J. A. de A. C.; ABREU, E. M. de C.; DOS SILVA, V. dos S.; NICOLAU, R. A. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 947-954, 2011.

REIS FILHO, N. et al. Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 603-612, 2017.

RICHTER, G. T.; FAN, C. Y.; OZGURSOY, O.; McCOY, J.; VURAL, E. Effect of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in sprague-dawley rats. **Archives of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 132, n. 6, p. 637-641, 2006.

RICHTER, G. T.; BOWEN, T.; BOERMA, M.; FAN, C.-Y.; HAUER-JENSEN, M.; VURAL, E. Impact of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in irradiated rats. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 11, n. 2, p. 110-113, 2009.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 8, p. 991-1000, 2008.

STANLEY, B. J. et al. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 5, p. 511-522, 2013.

SZEZERBATY, S. K. F.; DE OLIVEIRA, R. F.; PIRES-OLIVEIRA, D. A. A.; SOARES, C. P.; SARTORI, D.; POLI-FREDERICO, R. C. The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 2, p. 315-321, 2018.

TARADAJ, J. et al. Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 1105-1112, 2018.

TEIXEIRA NETO, N. et al. Tratamento cirúrgico das feridas complexas. **Revista de Medicina** (São Paulo), jul.-dez.; v. 89, n. 3. p. 147-152, 2010.

TIM, C. R. et al. A comparison of three methods for the analysis of skin flap viability: reliability and validity. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 5, p. 1-7, 2018.

TRAJANO, E. T. L. et al. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1297-1304, 2015.

VAGHARDOOST, R. et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 3, p. 603-607, 2018.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 294-301, 1998.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, n. 1, p. 39-44, 2003.

WU, S.; ZHOU, F.; WEI, Y.; CHEN, W. R.; CHEN, Q.; XING, D. Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 5, p. 733-746, 2014.

YOUNG, T.; FOWLER, A. Tratamento de feridas: gerenciamento de enfermagem nos locais doadores e receptores de enxertos de pele. **Nursing** (São Paulo), v. 1, n. 3, p. 18-25, 1998.