



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



**ALBAIZA NICOLETTI OTTERÇO**

**AÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO (670nm) ISOLADA OU  
ASSOCIADO A VITAMINA A E ACIDO CARBOXIETIL  
GAMA AMINOBUTÍRICO (CEGABA) NO PROCESSO DE  
REPARO TECIDUAL DE FERIDAS EM RATOS**

**Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto**

**SÃO CARLOS-SP**

**2018**

**ALBAIZA NICOLETTI OTTERÇO**

**AÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO (670nm) ISOLADA OU  
ASSOCIADO A VITAMINA A E ÁCIDO CARBOXIETIL GAMA  
AMINOBTÍRICO (CEGABA) NO PROCESSO DE REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

**SÃO CARLOS-SP**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Albaiza Nicoletti Otterço, realizada em 26/02/2018:

---

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
UFSCar

---

Prof. Dr. Cleber Ferraresi  
USC

---

Prof. Dr. Andre Capaldo Amaral  
UNIARA

---

Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro  
USP

---

Profa. Dra. Mariana Árias Avila Vera  
UFSCar

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

“Se as rugas na testa são inevitáveis, não deixes que elas se inscrevam  
no coração, o espírito não precisa envelhecer...”  
(James Garfield)

*Dedico esse trabalho aos meus queridos  
pais, **Albano e Izabel** por todo o incentivo  
e por caminharem sempre junto a mim.  
E dedico também à minha filha **Nicole**,  
por ser minha fonte de inspiração e Fé.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Aos meus pais Albano Otterço e Izabel Nicoletti Otterço pelos exemplos imensuráveis de honestidade, dedicação e por me ensinarem em todos os instantes o verdadeiro sentido da nossa existência humana.

À minha filha Nicole Nicoletti de Vasconcellos, por ser a pessoa mais importante da minha vida, por estar ao meu lado em todos os momentos me motivando e acreditando nos meus sonhos.

Ao meu orientador Nivaldo pela paciência, força e contribuição desde o início da minha caminhada na graduação até aqui no doutorado, demonstrando, ser exemplo imensurável de verdadeiro mestre.

Às amigas Patrícia Brassolatti e Ana Laura M. de Andrade, que sempre estiveram presente desde o início deste estudo, doando-se mais de si, sem pensar em si, e que agradeço infinitamente por toda ajuda, amizade e companheirismo vivido.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado, protegido e dado sabedoria para enfrentar todas as dificuldades encontradas nessa caminhada.

À toda minha família, pais, irmãs, sobrinhos e filha, por sempre me apoiarem e torcer pelas minhas conquistas.

Ao pessoal do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, por disponibilizarem os equipamentos e materiais utilizados em partes deste estudo.

Também ao pessoal do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, por disponibilizarem recursos na elaboração de parte deste estudo.

Às professoras Dra. Lucimar R.S.de Avó, Dra Karina N.Z. Pinto e Dra. Heloísa S.S. de Araújo, por toda a atenção e contribuição na realização deste estudo.

À professora Dra Fernanda Anibal, pelas orientações, incentivo e amizade.

Ao professor Me. Carlos Castro, por mostrar que sempre podemos gerar luz mesmo sem recursos próprios e equipamentos adequados, e sempre me motivar no meu aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelos momentos compartilhados.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de fisioterapia da UFSCar pela ajuda, socorro e boas risadas durante todo o período de elaboração deste estudo.

Aos colegas do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, Carla, Felipe, Rafael, Bianca, Paulo, Ana Claudia, Bia, Rebeca, pelo acolhimento e convívio.

Aos grandes amigos Paulo Bossini, Daiana Orth, Júlia Parisi, Genoveva F. Luna, Patrícia Brassolatti e Ana Laura M. Andrade, pelo convívio, parceria e eterna gratidão.

Muito Obrigada a todos!

## RESUMO

A fotobiomodulação (FBM) vem sendo indicada em casos de reparação tecidual devido a características como: estimulação à proliferação de fibroblastos, redução do processo inflamatório e aceleração na síntese de colágeno. O objetivo deste estudo foi analisar a ação do laser 670 nm isolado e associado à aplicação tópica da vitamina A e ácido carboxietil gama aminobutírico (CEGABA) no tratamento de feridas no dorso de ratos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da UFSCar. 60 ratos Wistar, machos foram divididos em 6 grupos (n=10), sendo Controle (GC); Laser (GL), GaAlAs 670 nm pulso contínuo, potência 30mW, densidade de energia 14,28J/cm<sup>2</sup>, irradiando 1 ponto por ferida por 30s; Vitamina A (GVitA) em base com elevado teor hidrolipídico; CEGABA (GCg) 1% de CEGABA/volume em base com elevado teor hidrolipídico; Laser + Vitamina A (GLVitA); Laser + CEGABA (GLCg). Foram induzidas 3 feridas de 10mm de diâmetro cada, por *punch* dermatológico, no dorso do animal. O tratamento totalizou 15 dias consecutivos. As coletas das amostras ocorreram no 4º, 11º e 16º dias para análises histológica de HE, Picrosirius-Red, imunohistoquímica (COX-2, TNF- $\alpha$ , VEGF e colágeno tipo I). Para as análises estatísticas foram utilizados o teste de ANOVA one-way e two-way para as avaliações intra e entre-grupos e o pós-teste de Tukey e Bonferroni, respectivamente. O nível de significância foi de 5%. Os resultados da análise histopatológica mostraram uma diminuição do infiltrado inflamatório para o grupo GL quando comparado com ao GVitA no 4º dia e para o GC no 4º e 16º da; e para o aumento do colágeno no GL no 11º e 16º dias de tratamento comparado ao GC. Houve diferença estatística significativa para o aumento de VEGF no 4º e 11º dias para o GL e GL + VitA quando comparados aos demais grupos; diminuição de TNF- $\alpha$  no 4º e 11º dia para o GL comparado aos demais grupos e aumento de colágeno tipo 1 no 4º e 16º dias para o GL em relação aos demais grupos. A análise de birrefringência das fibras de colágeno no 11º dia do tratamento teve aumento estatístico significativo para o GL em relação aos demais grupos. Diante dos resultados apresentados neste estudo, é pertinente ressaltar que a FBM e a vitamina A aplicadas isoladamente promoveram estímulos positivos no processo de cicatrização de feridas cutânea em ratos e a FBM associada à aplicação tópica de Vitamina A apresentou estímulos benéficos para os mecanismos envolvidos na fase inflamatória

**Palavras Chaves:** Ácido Carboxietil Gama Aminobutírico, Ferida de Pele, Fotobiomodulação, Laser 670nm, Reparo Tecidual, Vitamina A



## ABSTRACT

Photobiomodulation (FBM) has been indicated in cases of tissue repair due to characteristics such as: stimulation of fibroblast proliferation, reduction of the inflammatory process, and acceleration of collagen synthesis. The objective of the present study was to evaluate the application of the 670 nm laser isolated and associated with the vitamin A and carboxyethyl gamma aminobutyric acid (CEGABA) in the treatment of wounds on the back. This study was approved by the Animal Ethics Committee of UFSCar. 60 male Wistar rats were divided into 6 groups (n = 10), with Control (CG); Laser (LG); GaAlAs 670nm continuous pulse, 30mW power, energy density 14.28J/cm<sup>2</sup>, irradiating 1 spot per wound for 30s; Vitamin A (VitAG) on a high hydrolipidic basis; CEGABA (CgG) 1% CEGABA/volume on a high hydrolipidic basis; Laser + Vitamin A (LVitAG) Laser + CEGABA (LCgG). Three wounds of 10mm diameter were induced by dermatological punch on the animal's back. The treatment totaled 15 consecutive days. Samples were collected on the 4th, 11th and 16th day for histological analysis of HE, Picrosirius-Red, immunohistochemistry (COX-2, TNF- $\alpha$ , VEGF and collagen I). For the statistical analyzes, the one-way and two-way ANOVA test were used for the intra and inter-group evaluations, respectively, and the Tukey and Bonferroni post-test. The level of significance was 5%. The results for the histopathological analysis showed a statistically significant difference for lower values of inflammatory infiltrate in LG versus GG on the 16th day; in LG versus CG and VitAG on the 4th day; and for the increase of collagen in LG versus CG on the 11th and 16th days of treatment. There was a statistically significant difference for the increase of VEGF on the 4th and 11th day for LG and L+VitAG when compared to the other groups. Decrease of TNF- $\alpha$  on the 4th and 11th day for LG and increase of collagen type 1 on the 4th and 16th days in LG when compared to the other groups. The birefringence analysis was a statistically significant difference for increase of collagen fibers on the 11th day for LG when compared to the other groups. In view of the presented results, it is pertinent to point out that FBM is effective in helping the kinetics of the cutaneous wound healing process in rats and promoted the necessary stimuli so that the healing process evolved with quality and in a satisfactory way, tissue considered structurally desirable.

Keywords: Carboxyethyl Aminobutyric Acid, Wound Skin, Photobiomodulation, Laser 670nm, Tissue Repair, TNF- $\alpha$ , Vitamin A

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	= Porcentagem
*	= presença de infiltrado inflamatório
±	= Mais ou Menos
≥	= maior ou igual
#	= reepitelização da ferida
ANOVA	= Análise de variância
CA	= Califórnia
cm	= Centímetro
cm <sup>2</sup>	= Centímetro quadrado
COX-2	= Ciclo-oxigenase-2
EESC-USP	= Instituto de Física da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo
EUA	= Estados Unidos da América
FBM	= Fotobiomodulação
GaAlAs	= Arseneto de Gálio Alumínio
GC	= Grupo controle
GCeg	= Grupo ácido carboxietil gama aminobutírico
GL	= Grupo laser
GL+Ceg	= Grupo laser e grupo ácido carboxietil gama aminobutírico
GL+VitA	= Grupo laser e grupo vitamina A
GVitA	= Grupo vitamina A
h	= horas
HE	= hematoxilina e eosina

IgG	= imunoglobulina G
IL-10	= interleucina 10
J	= Joules
J/cm <sup>2</sup>	= Joules/centímetros quadrados
kg	= quilogramas
MEC	= Matriz extracelular
mg	= miligramas
min	= minutos
mm	= milímetros
mW	= mili watts
n	= número
nm	= nanômetro
°C	= Graus celsius
PBS	= tampão fosfato-salino
s	= segundos
SP	= São Paulo
TG	= Tecido de granulação
TNF	= fator de necrose tumoral
TS	= Tecido ao redor
VEGF	= fator de crescimento endotelial vascular
W	= Watts
µm	= micrometro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração do decurso de tempo das diferentes células que aparecem na ferida, durante o processo de reparação (Adaptado de: CHOW, 2014).....21
- Figura 2:** Mecanismo de ação da fotobiomodulação (FBM) no processo de reparação tecidual. A luz é inicialmente absorvida pelo cromóforo mitocondrial (citocromo c oxidase) com aumento da produção de ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Adaptado de: AVCI, 2013). .....23
- Figura 3:** Ilustração da fórmula molecular (C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>) da CEGABA. Fonte: <http://en.chembase.cn/molecule-104166.html>..... 24
- Figura 4:** Ilustração da fórmula molecular (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O) da Vitamina A. Fonte: <http://laboratoriobiolider.com.br/media/images/801.pdf>..... 25
- Figura 5:** Ilustração da realização das três feridas por procedimento cirúrgico utilizando *punch* dermatológico de 10mm (Fonte: Arquivo Pessoal) .....28
- Figura 6:** Aplicação da FBM com o feixe de luz abrangendo toda a área da ferida. (Fonte: Arquivo Pessoal) .....30
- Figura 7:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise ..... 31

**Figura 8:** Ilustração da realização das três feridas por procedimento cirúrgico utilizando *punch* dermatológico de 10mm (Fonte: Arquivo Pessoal) ..... 42

**Figura 9:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise ..... 44

**Figura 10:** Avaliação quantitativa da análise histopatológica dos valores de expressão do colágeno e infiltrado inflamatório para os GC (grupo controle), e GL(grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5%..... 48

**Figura 11:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes ao infiltrado inflamatório, expressão de colágeno e reepitelização da ferida. A: GC-4 (grupo controle no 4ºdia); B: GC-11 (grupo controle no 11ºdia); C: GC-16 (grupo controle no 16ºdia); D: GL-4 (grupo laser no 4ºdia); E: GL-11 (grupo laser no 11ºdia); e F: GL-16 (grupo laser no 16ºdia); (n=8). Os símbolos seta branca, # e \* indicam a expressão de colágeno tipo I, a reepitelização da ferida e a presença de infiltrado inflamatório respectivamente (100x)..... 49

**Figura 12:** Análise quantitativa da imunoexpressão do VEGF, TNF-a e Colágeno tipo I para os GC (grupo controle), e GL(grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5%..... 50

**Figura 13:** Análise quantitativa da birrefringência para os GC (grupo controle), e GL(grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5% ..... 51

**Figura 14:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes à birrefringência das fibras colágenas da ferida. A: GC-4 (grupo controle no 4ºdia); B: GC-11 (grupo controle no 11ºdia); C: GC-16 (grupo controle no 16ºdia); D: GL-4 (grupo laser no 4ºdia); E: GL-11 (grupo laser no 11ºdia); e F: GL-16 (grupo laser no 16ºdia); (n=8). As setas brancas indicam a fibra de colágeno (100x)..... 52

**Figura 15:** Ilustração da realização da ferida por procedimento cirúrgico utilizando *punch* de 10mm (Fonte: Arquivo Pessoal)..... 66

**Figura 16:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise ..... 68

**Figura 17:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes ao infiltrado inflamatório. A: GC (grupo controle);B: GVitA (grupo VitaminaA); C: GL (grupo Laser) e D: GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA) (n=10). Seta preta indica a presença do infiltrado inflamatório (100x)..... 71

**Figura 18:** Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no 4º dia após a lesão. GC (grupo controle), GL (grupo Laser), GVitA (grupo VitaminaA) e GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA), com nível de significância de \*5% (n=10)..... 72

**Figura 19:** Análise imunohistoquímica da expressão da COX-2 e do fator VEGF por imunomarcção no 4º dia de tratamento. A: GC(grupo controle); B: GL(grupo Laser); C: GVitA(grupo VitaminaA) e D: GL+VitA(grupo Laser+VitaminaA). \*indica a imunomarcção em cor acastanhada onde estão expressos ambos fatores analisados (100).. 73

<b>Figura 20:</b> Análise semi-quantitativa em A da COX-2 e em B do VEGF, no 4º dia após a lesão. GC (grupo controle), GL (grupo Laser), GVitA (grupo VitaminaA) e GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA), com nível de significância de *5% (n=10).....	74
<b>Figura 21:</b> Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no 4º, 11º e 16º dias após a lesão. GC (grupo controle), GCegaba (grupo Cegaba), GL (grupo Laser) e GL+GCegaba (grupo Laser+Cegaba), com nível de significância de *5% (n=10).....	84
<b>Figura 22:</b> Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão da COX-2 no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x) .....	86
<b>Figura 23:</b> Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão da TNF- $\alpha$ no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x) .....	87
<b>Figura 24:</b> Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão do VEGF no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x) .....	88
<b>Figura 25:</b> Análise quantitativa da imunexpressão do VEGF, TNF-a e COX-2 para os GC (grupo controle), GCegaba (grupo Cegaba), GL (grupo Laser) e GL+GCegaba (grupo Laser+Cegaba), com nível de significância de *5% (n=10).....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM .....	29
<b>Tabela 2:</b> Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa da reepitelização do tecido e expressão do colágeno em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.....	32
<b>Tabela 3:</b> Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina .....	33
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM .....	43
<b>Tabela 5:</b> Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa da reepitelização do tecido e expressão do colágeno em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.....	45
<b>Tabela 6:</b> Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina .....	46
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM .....	67
<b>Tabela 8:</b> Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. ....	69



## SUMÁRIO

<b>PARTE 1</b>	<b>18</b>
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	20
2.1. Mecanismos de lesão e reparação tecidual .....	20
2.2. Fotobiomodulação (FBM) .....	21
2.3. CEGABA (ácido carboxietil gama aminobutílico) .....	23
2.4. Vitamina A .....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Animais de experimentação.....	27
4.2. Procedimento cirúrgico.....	28
4.3. Tratamento por fotobiomodulação (FBM) .....	28
4.4. Loção tópica com Vitamina A e CEGABA.....	30
4.5. Coleta das amostras .....	31
4.6. Eutanásia.....	31
4.7. Análise histopatológica.....	31
4.8. Análise imunohistoquímica .....	33
4.9. Análise de birrefringência .....	34
4.10. Análise estatística.....	34
<b>PARTE I</b>	<b>36</b>
5. ESTUDO 1 .....	37
5.1 Introdução.....	40
5.2 Materiais e Métodos .....	41
5.2.1 Animais de experimentação.....	41
5.2.2 Procedimento Cirúrgico.....	42
5.2.3 Tratamento por Fotobiomodulação .....	43
5.2.4 Coleta das amostras .....	44
5.2.5 Eutanásia.....	44

5.2.6	Análise Histopatológica.....	44
5.2.7	Análise Imunohistoquímica.....	46
5.2.8	Análise de Birrefringência.....	47
5.2.9	Análise Estatística.....	47
5.3	Resultados.....	48
5.3.1	Análise Histopatológica.....	48
5.3.2	Análise Imunohistológica.....	49
5.3.3	Análise Birrefringência.....	51
5.4	Discussão.....	52
5.5	Conclusão.....	55
5.6	Referencia Bibliográficas.....	56
6.	ESTUDO 2.....	61
6.1	Introdução.....	63
6.2	Materiais e Métodos.....	65
6.2.1	Procedimento Cirúrgico.....	66
6.2.2	Terapia por Fotobiomodulação.....	67
6.2.3	Loção tópica com vitamina A.....	67
6.2.4	Eutanásia.....	68
6.2.5	Análise Histopatológica.....	69
6.2.6	Análise Imunohistoquímica.....	69
6.2.7	Análise Estatística.....	70
6.3	Resultados.....	71
6.3.1	Análise Histopatológica.....	71
6.3.2	Análise Imunohistoquímica.....	72
6.4	Discussão.....	74
6.5	Conclusão.....	78
6.6	Referência Bibliográficas.....	78
<b>PARTE III</b>		<b>83</b>
7.	RESULTADOS NÃO SUBMETIDOS – CEGABA.....	84

7.1. Análise Histopatológica.....	84
7.2. Análise Imunohistoquímica.....	85
7.2.1. Imunoexpressão da COX-2.....	85
7.2.2. Imunoexpressão do TNF- $\alpha$ .....	86
7.2.3. Imunoexpressão do VEGF .....	87
8. CONCLUSÕES .....	90
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS / LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	91
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	93
ANEXOS	

## **PARTE I**

---

### **1. INTRODUÇÃO**

### **2. CONTEXTUALIZAÇÃO**

### **3. OBJETIVOS**

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de recursos terapêuticos e recursos tópicos para recuperar o tecido epitelial danificado por feridas ou foto envelhecimento vêm crescendo exponencialmente nas últimas décadas. Em contrapartida, cabem de um embasamento científico a fim de estabelecer, protocolos mais seguros e eficazes indicados para estes tipos de lesões (FARAGE, et al., 2013).

Um dos tratamentos que demonstram bons resultados na reparação tecidual, por desempenhar auxílios em todas as etapas do processo de reparo é a fotobiomodulação (FBM), que se destaca por ser considerado um recurso não invasivo, seguro e eficaz, tanto como terapia isolada como associada a outros tipos de recursos biológicos e tecnológicos (GUIRRO, et al., 2010).

Produtos farmacológicos como o ácido carboxietil gama aminobutírico (CEGABA) são muito utilizados na área dermatofuncional, porém com limitado embasamento científico. O CEGABA é um neuromodulador, encontrado no sistema nervoso de mamíferos, que possui atividade biológica capaz de estimular a síntese de fatores de crescimento celular que participam do estímulo a mitose celular (CERINO, et al., 1985).

Outro recurso tópico recentemente investigado é a aplicação de vitamina A, pois suas ações na defesa contra infecções do epitélio podem favorecer o restabelecimento tecidual, por atuar na modulação do colágeno e promover nutrição da membrana mucosa, o que confere melhor resistência contra possíveis infecções (YUEN, et al., 2004).

Neste sentido, a associação de recursos tópicos à FBM é de grande valia e pode reduzir o tempo de cura e promover uma melhor qualidade de reparo tecidual.

## 2. CONTEXTUALIZAÇÃO

### 2.1. Mecanismos de lesão e reparação tecidual

A partir do momento em que ocorre um trauma tecidual, um conjunto de processos biológicos e bioquímicos, que englobam cascatas celulares, com o intuito de reestabelecer o local lesado. Este processo é conhecido como reparo tecidual, e engloba três diferentes fases que se sobrepõem durante o tempo e são denominadas como inflamação, proliferação e remodelamento (ENNIS, et al., 2007).

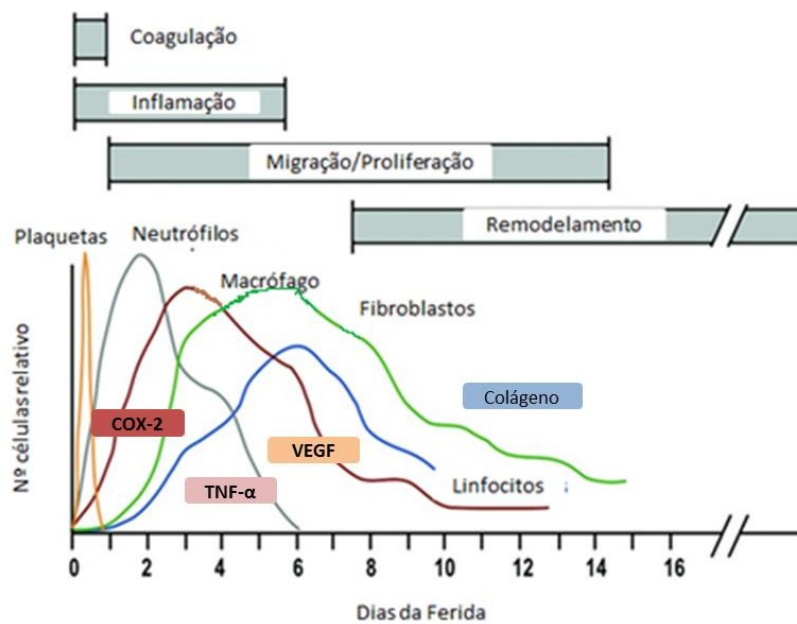
A fase da inflamação tem início com a ativação da fibroplasia e formação do tecido de granulação que perdura por até quatro dias. Neste período são observados recrutamento intenso de neutrófilos e macrófagos, além de síntese e liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento específicos. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) é um importante mediador inflamatório nesta fase, sendo que quantidades excessivas está associada com doenças inflamatórias crônicas, que evoluem para quadros de cicatrizes indesejáveis (CHILDS, et al., 2017).

Também nesta fase são encontradas glicoproteínas diméricas como a cicloxigenase (COX) que exibe duas isoformas: COX-1 e COX-2, sendo que a via de COX-2 está envolvida na produção de importantes mediadores pró-inflamatórios do processo fisiopatológico (ZHANG et al., 2003; WILGUS, et al., 2004; KAPOOR et al., 2007).

Na fase proliferativa, os fibroblastos produzem o colágeno que sustenta uma rede de capilares que mantém a base da formação do tecido de granulação, promovendo o crescimento de capilares ao redor da lesão, os quais normalmente mantêm sua ação pelo período de 5 a 14 dias (MUZZARELLI, et al., 2009). Nesta fase ainda ocorre a proliferação de células endoteliais que são estimuladas por fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) que irão atuar na angiogênese (BAO, et al., 2009).

Já na fase de remodelamento, ocorre a deposição de colágeno de maneira organizada e com estrutura mais fina do que o colágeno presente na pele normal. Porém com o tempo este colágeno se torna mais espesso e se torna mais organizado ao longo das linhas de tensão (CHILDS, et al., 2017).

No decorrer do processo de cicatrização, diferentes picos de atividade celular são previstos e tal fato está diretamente relacionado à fase biológica determinada em sua evolução, com isso alguns tipos celulares se destacam (CHOW, 2014). Os eventos celulares e suas células principais estão representados na Figura 1.



**Figura 1:** Ilustração do decurso de tempo das diferentes células que aparecem na ferida, durante o processo de reparação (Adaptado de: CHOW, 2014).

## 22 Fotobiomodulação

Considerando os mecanismos envolvidos no reparo dos tecidos após lesão tecidual, bem como as propriedades físicas do meio e processos regenerativos, a modalidade da FBM tem sido utilizada com sucesso na regeneração de lesões, por promover efeitos fotobiológicos que estimulam a cicatrização de tecidos (PARIZOTTO, 1998; BRASSOLATTI et al., 2016).

A eficiência da FBM nos mecanismos do processo de reparação tecidual seja por vias proliferativas e energéticas, transdução de sinais elétricos, bioquímicos ou atividade imunitária, dependem de parâmetros como comprimento de onda eletromagnética, dose, área do feixe de luz, especificidade tecidual, tempo e tipo de lesão (BOSSINI, et al., 2009).

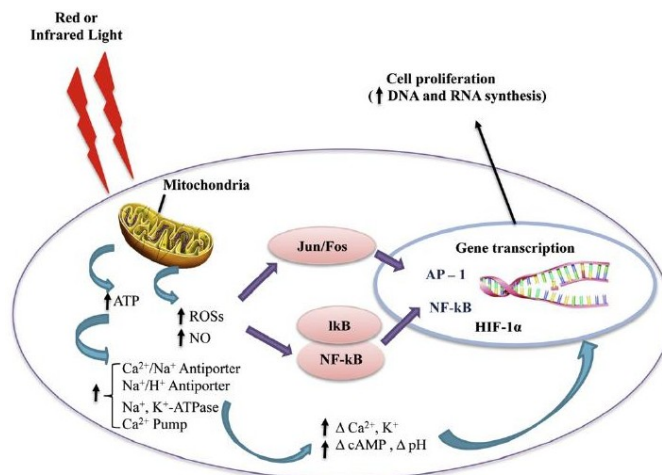
A FBM tem indicação efetiva em casos de reparação tecidual, devido a características como: estimulação à proliferação de fibroblastos (FORTUNA, et al., 2017), redução do processo inflamatório (BAYAT, et al., 2005 e GUIRRO, et al., 2010), aceleração na síntese de colágeno (MELO, 2011) e no processo de cicatrização de feridas na pele (KUBOTA, 2004; GAL, et al., 2006; SILVA, et al., 2010).

O mecanismo relacionado com a FBM ainda não é totalmente compreendida. Seu mecanismo biológico básico é descrito pela absorção de luz vermelha pelos cromóforos mitocondriais, em particular o Citocromo C Oxidase (CCO) que atua como um fotoreceptor, contido na cadeia respiratória localizada dentro das mitocôndrias e também por fotorreceptores na membrana plasmática das células (KARU, et al., 2004 e KARU, et al., 2005).

Segundo estudo de Karu (2010) há mecanismos celulares que são facilitados pela FBM devido à ação nos cromóforos mitocondriais aumentando a produção de ATP. Ocorrem mudanças primárias, como alterações nas propriedades redox dos componentes da cadeia respiratória das células, entre outros, e mudanças secundárias como a transdução.

A figura 2 descreve o mecanismo de ação da FBM no processo de reparação tecidual descrito por Avcı, et al., (2013).





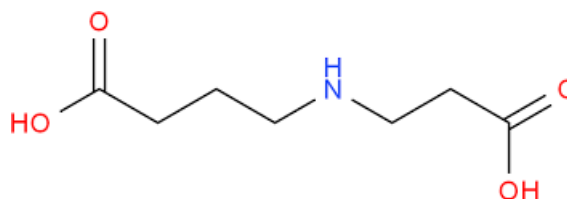
**Figura 2:** Mecanismo de ação da fotobiomodulação (FBM) no processo de reparação tecidual. A luz é inicialmente absorvida pelo cromóforo mitocondrial (citocromo c oxidase) com aumento da produção de ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Adaptado de AVCI, 2013).

### 23. Ácido Carboxietil Gama Aminobutírico

A poliamida CEGABA, atualmente vem sendo utilizada em larga escala na área dermatofuncional por apresentar aumento significativo na taxa de proliferação de fibroblastos, produção das fibras de colágeno nos tecidos na pele, ação no metabolismo celular, diminuindo a celulite, ativando a microcirculação e ativando e reestruturando o crescimento capilar, porém estudos científicos que comprovem estes efeitos não são encontrados na literatura.

Sua investigação científica refere-se apenas ao grupo dos pesquisadores da Universidade de Pávia, Itália nas décadas de 80 e 90 (CERINO, 1985). Sendo assim, estudos nesta área, são importantes para investigar seus efeitos na indução, síntese e proliferação celular. (CERINO, et al., 1988 e 1985).

A CEGABA é um aminoácido, derivada do ácido gama-aminobutírico (GABA) que possui um agrupamento carboxietil associado (Figura 3).



**Figura 3:** Ilustração da fórmula molecular (C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>) da CEGABA. Fonte: <http://en.chembase.cn/molecule-104166.html>.

Referindo-se a estimulação, síntese e crescimento celular, estudos de Cerino (1985) na área da regeneração tecidual, demonstraram que subprodutos a partir de culturas de células endoteliais humanas podem facilitar o efeito da promoção de crescimento em hibridoma (linhagens celulares desenvolvidas para produzir um anticorpo desejado em grande quantidade).

A CEGABA demonstra ainda possuir menor toxicidade e maior estimulação do fator de crescimento em comparação com demais poliaminas. Comparada com outros fatores de crescimento, os efeitos e mecanismos de ação da CEGABA e ECGS sobre o crescimento de hibridomas são semelhantes (FUSSI, et al., 1987).

## 24 Vitamina A

Recursos tópicos com base em vitamina A também são investigados na reparação de feridas de pele. O termo vitamina A refere-se a um grupo de compostos, que inclui retinol, retinaldeído e ácido retinóico (Figura 4). Do ponto de vista formal, o termo vitamina A inclui ainda os carotenóides, com atividade pró-vitamina A, que atuam como precursores alimentares do retinol (RONCADA, et al., 1998; HUNT, et al., 1986).

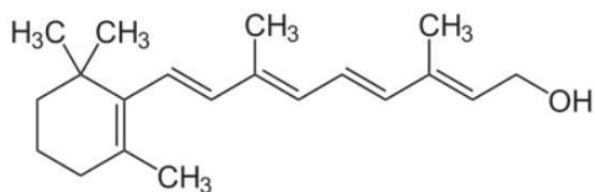


Figura 4: Ilustração da fórmula molecular (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O) da Vitamina A.

Fonte: <http://laboratoriobiolider.com.br/media/images/801.pdf>

Estudos verificam a ação de seu princípio ativo na dinâmica da regeneração tecidual, como a formação da matriz extracelular, angiogênese, fibroplasia e síntese de glicoproteínas, podendo contribuir para a reepitelização de feridas (YUEN, et al., 2004; ABDELMALEK, 2006).

A vitamina A desempenha um importante papel na regulação do crescimento das células epiteliais e manutenção da integridade das mesmas, sendo que parte do desenvolvimento da epiderme é controlada por essa vitamina. Há evidências de que pode também alterar ou modular a síntese de colágeno. Após a aplicação tópica de vitamina A, a pele é estimulada para produzir mais proteína epidérmica e para tornar a epiderme mais espessa, coberta de camada de queratina melhor formada, otimizando o tempo de cura, além de auxiliar na elasticidade do novo tecido (WICKE, et al., 2000; YUEN, et al., 2004).

### 3. OBJETIVOS

Analisar os mecanismos de ação da FBM (670 nm), associado ou não a tratamentos tópicos de vitamina A e CEGABA, no mecanismo celular pertencente ao processo de reparação tecidual de feridas cirúrgicas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a ação da FBM (670nm) quanto à presença de infiltrado inflamatório, colágeno tipo I, TNF- $\alpha$  e VEGF nas diferentes fases do processo de reparo;
- Avaliar a ação da FBM (670nm) associado ou não, à loção tópica de vitamina A quanto à presença de infiltrado inflamatório, COX-2 e VEGF na fase inflamatória do processo de reparo.
- Analisar a ação da FBM (670nm) associado ou não, à loção tópica de CEGABA, quanto à presença de infiltrado inflamatório, COX-2, TNF- $\alpha$  e VEGF nas diferentes fases do processo de reparo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais de experimentação

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar, nº 2-007/2014 (Anexo A). Primeiramente foi realizado teste piloto para verificação da metodologia aplicada neste estudo.

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, adultos, aproximadamente 250 a 300g, mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, em um total de 16 dias, sendo alocados individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com livre acesso a água e ração apropriada.

Os animais foram alocados de modo aleatório em 6 grupos (n=10):

- Grupo Controle (GC): Realização das feridas e simulação da FBM;
- Grupo Laser (GL): Realização das feridas e tratamento com FBM (670 nm, 30mW, 14,28J/cm<sup>2</sup>);
- Grupo Vitamina A (GVitA): Realização das feridas com aplicação de loção tópica com Vitamina A;
- Grupo Laser + Vitamina A (GL+VitA): Realização das feridas e tratamento com FBM (670nm, 30mW, 14,28J/cm<sup>2</sup>) + aplicação de loção tópica com Vitamina A.
- Grupo CEGABA (GCegaba): Realização das feridas e tratamento com loção tópica com CEGABA.
- Grupo Laser + CEGABA (GL+Cegaba): Realização das feridas e tratamento com FBM (670nm, 30mW, 14,28J/cm<sup>2</sup>) + aplicação de loção tópica com CEGABA.

#### 42. Procedimento Cirúrgico

Para a realização das feridas os animais foram previamente pesados e anestesiados por Ketamina (40 mg/kg, Agener, SP, Brazil) e Xilasina (15 mg/ kg, Dopaser, SP, Brazil). Em seguida os animais foram mantidos em decúbito ventral, para a tricotomia digital da região dorsal.

Em seguida os animais foram mantidos em decúbito ventral, para a tricotomia digital da região dorsal. Posteriormente, foram realizadas três lesões por punch dermatológico de 10mm de diâmetro com lâmina circular compreendendo todas as 3 camadas da pele, equidistante 1cm entre si, no dorso de cada animal (Moreira, 2015), (Figura 5).



**Figura 5:** Ilustração da realização das três feridas por procedimento cirúrgico utilizando *punch* dermatológico de 10mm (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 43. Tratamento por fotobiomodulação

A FBM foi realizada com um laser vermelho (LASERPULSE, IBRAMED, Brasil), comprimento de onda de 670nm, potência de saída de 30mW, densidade de energia 14,28 J/cm<sup>2</sup> e área transversa do feixe de 0.063cm<sup>2</sup>. O equipamento foi calibrado previamente ao início do experimento no Instituto de Física da Escola de Engenharia de São Carlos da

Universidade de São Paulo (EESC-USP) por um técnico qualificado. A aplicação iniciou-se uma hora após a indução da lesão, e decorreu com aplicações diárias efetuadas em um único ponto posicionado perpendicularmente ao dorso do animal, com distância de 5mm da pele, de modo contínuo, com o feixe de luz abrangendo toda a área da ferida totalizando ao final; 3, 10 e 15 aplicações de acordo com os tempos experimentais avaliados (Figura 6). O GL recebeu a FBM ininterruptamente, até o momento em que ocorreu a coleta da amostra em cada tempo experimental proposto, ou seja, 4, 11 e 16 dias. No momento do tratamento, os animais foram imobilizados por uma manta de algodão que serviu de auxílio tanto para a aplicação da terapia quanto para minimizar o estresse ocasionado ao animal. O GC recebeu aplicação da FBM de modo simulado. Os parâmetros detalhados da FBM estão expressos na tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Potência (mW)</b>	<b>30</b>
<b>Irradiância(mW/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>0,038</b>
<b>Comprimento de Onda (nm)</b>	<b>670</b>
<b>Modo de ação</b>	<b>Contínuo</b>
<b>Área transversa do feixe (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>0.063</b>
<b>Densidade de Energia (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>14,28</b>
<b>Tempo (s)</b>	<b>30</b>
<b>Nº de pontos de irradiação</b>	<b>1</b>
<b>Energia (J)</b>	<b>0.9</b>



**Figura 6:** Aplicação da FBM com o feixe de luz abrangendo toda a área da ferida. (Fonte: Arquivo pessoal).

#### **44. Loção tópica com vitamina A e CEGABA**

Os grupos tratados por a loção tópica com vitamina A (Retinol), ou com CEGABA, tiveram o início da aplicação uma hora após a realização da cirurgia.

A loção de vitamina A foi aplicada diariamente sobre a ferida, durante o período experimental que totalizou um máximo de 4 aplicações de 5mg, de forma que a área total da ferida fosse completamente recoberta. A loção foi composta por 10.000 UI de vitamina A/volume em base de 100g, com elevado teor hidrolipídico (Laboratório Essenziale, Novo Hamburgo, RS-Brasil).

Os grupos que receberam tratamento de loção com CEGABA, também ocorreram diariamente, totalizando 15 aplicações, sendo a loção espalhada sobre a ferida, de forma que fosse totalmente recoberta. A loção foi composta de 1% de CEGABA/volume em base de 100g, com elevado teor hidrolipídico (Laboratório Essenziale, Novo Hamburgo, RS-Brasil).

É importante destacar que nos grupo GL+VitA e GL+Cegaba, primeiramente foram realizados a FBM e imediatamente após foi aplicada a loção recobrindo toda a área da ferida.



#### 45. Coleta das amostras

As amostras de tecido foram coletadas utilizando *punch* dermatológico, com área total de 10mm, no 4º, 11º e 16º dia do tratamento. A escolha da amostra a ser coletada em cada período experimental, foi determinada de maneira aleatória a fim de evitar risco de viés (Figura 7).



**Figura 7:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise.

#### 46. Eutanásia

Os animais sofreram eutanásia, por decapitação com guilhotina, no 16º dia após a realização da ferida cirúrgica.

#### 47. Análise histopatológica

Imediatamente após a coleta da amostra para análise, foi realizado corte longitudinalmente do tecido (tendo como referência o eixo crânio-caudal do animal, abrangendo tanto o centro como a margem inicial da ferida e parte do tecido sadio) com bisturi, sendo fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e após, mantido em álcool 70% e processado para inclusão em parafina. Para a confecção das lâminas as amostras de tecido foram seccionadas em 5µm de espessura.

Foram obtidas três secções de cada amostra, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck) e analisadas. A avaliação histopatológica foi realizada utilizando um microscópio de luz (Zeiss Axioshop, Carl Zeiss, com objetiva 20X), sendo avaliada a reepitelização do tecido e a expressão do colágeno pela análise semiquantitativa, considerando os valores de 0-4, descrito na tabela 2 (Solmaz, 2016).

A expressão do infiltrado inflamatório foi analisada também pela avaliação semiquantitativa através de escores segundo Camacho-Alonso (2007), considerando os valores de 0-4, descrito na tabela 3.

Todas as análises foram realizadas por três avaliadores que foram cegados em relação aos grupos experimentais.

**Tabela 2:** Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa da reepitelização do tecido e expressão do colágeno em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

<b>Escala</b>	<b>Reepitelização</b>	<b>Expressão Colágeno</b>
<b>0</b>	Ausente	Ausente-TG
<b>1</b>	Espessura das bordas cortadas	Mínimo-TG
<b>2</b>	Migração de células	Leve-TG
<b>3</b>	Conexão da incisão	Moderado-TG
<b>4</b>	Queratinização	Marcado-TG

TG- tecido de granulação

**Tabela 3:** Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

<b>Escala de classificação histopatológica para avaliação de Infiltrado Inflamatório</b>	
<b>1</b>	Inflamação aguda (membrana piógena é formada)
<b>2</b>	Predominância da inflamação aguda difusa (predominância do tecido de granulação)
<b>3</b>	Predominância de inflamação crônica (fibroblastos começando a proliferar)
<b>4</b>	Resolução e cicatrização (redução ou desaparecimento de inflamação crônica, embora persistam células redondas ocasionais)

#### **4.8 Análise imunohistoquímica**

As amostras foram inseridas em lâminas silanizadas para uma melhor adesão do material biológico estudado e depois mantidos durante 24 h a 37°C. Após a desparafinização e a hidratação, as secções histológicas foram marcadas com uma caneta hidrofóbica e depois lavadas em uma solução tampão enriquecida com Tween duas vezes por 3 min. Após, as secções foram imersas em peróxido de hidrogênio durante 10 minutos e depois lavadas em solução tampão fosfato (PBS) duas vezes em 3 min e, finalmente, foram imersas em peroxidase endógena durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário.

Os anticorpos primários utilizados foram o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): anticorpo primário policlonal anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:400; fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ): anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:400, anticorpo primário policlonal anti-colágeno Tipo I (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200 e COX-2: anticorpo primário anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200. Todos foram incubados durante 2 h e lavados duas vezes em PBS.

Posteriormente as lâminas foram então submetidos a um anticorpo secundário (IgG anti-coelho), (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a uma concentração de 1:200 em PBS durante 30 min.

As imunomarcações do VEGF, TNF- $\alpha$ , colágeno tipo I e COX-2 foram avaliadas quantitativamente pelo Software Image J 1.37<sup>a</sup>.

#### **49. Análise de birrefringência**

Os cortes histológicos corados pelo método do Picrosirius-Red foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica, com objetiva de 20x) para avaliar a organização das fibras colágenas.

Para a realização da análise quantitativa foi utilizado o software ImageJ 1.37a para avaliar a porcentagem de coloração laranja-avermelhado. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes correspondem ao colágeno tipo I.

Três imagens por corte foram capturadas a uma ampliação de 20x (1°, 2 ° e 3 ° quadrante) da camada da derme especificamente. O software Color Deconvolution ImageJ foi utilizado para avaliar a porcentagem de coloração vermelha (colágeno) na área da imagem. Este software reconhece as cores da imagem e as decompõe em três cores básicas: azul (colágeno), vermelho e roxo. A análise morfométrica, correspondente à cor azul, foi medida como a porcentagem dos pixels totais em cada imagem usando Threshold color (software ImageJ), conforme descrito por Caetano, 2015.

#### **410. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As análises foram realizadas através do Software Graph PadPrism 5.0.

Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para as comparações intra e entre grupos foram utilizados respectivamente os testes de ANOVA one-way (estudo II) e two-way (estudo I), e os pós-testes de Tukey e Bonferroni. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## PARTE II

---

### 5. ESTUDO I

**“Mecanismos da Fotobiomodulação (FBM) na cinética do processo de cicatrização de feridas em ratos”**

*Aceito no periódico “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”*

*(ANEXO B)*

### 6. ESTUDO II

**“Ação da fotobiomodulação associado ou não ao retinol no processo inflamatório de feridas em ratos”**

*Aceito no periódico “Lasers in Medical Science” (ANEXO C)*

## 5. ESTUDO I:

### **“Mecanismos da Fotobiomodulação (FBM) na cinética do processo de cicatrização de feridas em ratos”**

Abaiza Nicoletti Otterço<sup>1,2</sup>, Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>, Patrícia Brassolatti<sup>3</sup>, Karina Nogueira Zambone Pinto<sup>3</sup>, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo<sup>4</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Fisioterapia do Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Votuporanga, SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas-DCF da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

<sup>5</sup> Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Uniara, Araraquara, SP, Brasil

<sup>6</sup> Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, São Paulo, SP, Brasil

## Resumo

**Objetivo:** O processo de cicatrização de lesões cutâneas é considerado um evento complexo dividido em fases distintas e sobrepostas, que responde satisfatoriamente à fotobiomodulação (FBM), que é indicada como recurso terapêutico capaz de auxiliar o de reparo tecidual. O objetivo do presente estudo foi analisar a cinética do processo de cicatrização de feridas cutâneas após aplicação do laser GaAlAs no tratamento de feridas no dorso de ratos. **Material e Métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da UFSCar. Os animais foram divididos em 2 grupos (n=10), sendo Controle (GC) e Laser (GL), GaAlAs, 670nm pulso contínuo, potência 30mW, densidade de energia 14,28J/cm<sup>2</sup>, irradiando 1 ponto por ferida por 30s, totalizando 15 dias consecutivos de tratamento. As coletas das amostras ocorreram no 4º, 11º e 16º dias para análises histológica de HE, Picrosirius-Red, imunohistoquímica (TNF- $\alpha$ , VEGF e colágeno tipo I). Para as análises estatísticas foram utilizados o teste de ANOVA two-way para as avaliações intra e entre-grupos, e o pós-teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** A análise histopatológica mostrou diferença estatística significativa para valores menores de infiltrado inflamatório no GL em relação ao GC no 16º dia; e para o aumento do colágeno no 11º e 16º dias de tratamento. Houve diferença estatística para o aumento de VEGF no 11º dia para o GL; diminuição de TNF- $\alpha$  no 4º e 11º dia para o GL e aumento de colágeno tipo 1 no 4º e 16º dias para o GL. A análise de birrefringência da porcentagem das fibras de colágeno apresentou no 11º dia do tratamento maior quantidade e diferença estatística e quanto à organização das fibras colágenas. No 11º dia houve melhor organização e arranjo para o GL. **Conclusão:** Diante dos resultados apresentados, é pertinente ressaltar que a FBM é eficaz em auxiliar a cinética do processo de cicatrização de feridas cutânea em ratos e promoveu os estímulos necessários para que o processo de cicatrização evoluísse com qualidade e de maneira satisfatória, proporcionando ao final, um tecido considerado estruturalmente desejável.

**PALAVRAS CHAVES:** Colágeno, Fotobiomodulação, Laser GaAlAs, Reparação Feridas



**Abstract**

**Objectives:** The healing process of cutaneous lesions is considered a complex event divided into distinct and overlapping phases, which responds satisfactorily to photobiomodulation (FBM). FBM is indicated as a therapeutic resource capable of assisting tissue repair. The present study aimed to analyze the kinetics of cutaneous wounds healing process after application of the GaAlAs laser for treating wounds on the dorsum of rats. **Materials and Methods:** This study was approved by the Animal Ethics Committee of UFSCar. The animals were divided into 2 groups (n = 10); control group (CG) and the laser group (LG) used GaAlAs, 670nm continuous pulse, 30mW power, 14.28J /cm<sup>2</sup> energy density, irradiating 1 point per wound for 30s, totaling 15 consecutive days of treatment. Samples were collected on the 4th, 11th and 16th days for histological analysis of HE, Picrosirius-Red, immunohistochemistry (Collagen1, TNF- $\alpha$ , VEGF). Statistical analyzes used the one-way ANOVA test for intra and inter group evaluations, and the Tukey post-test. Level of significance was 5%. **Results:** The histopathological analysis (HE) showed a statistically significant difference for lower values of inflammatory infiltrate in LG versus CG on the 16th day; and for the increase of collagen in the 11th and 16th days of treatment. There was a statistically significant difference in the increase of VEGF on the 11th day for LG; decrease of TNF- $\alpha$  on the 4th and 11th day for LG, and increase of collagen type 1 on the 4th and 16th days for LG. The birefringence analysis of the percentage of collagen fibers presented on the 11th day of treatment revealed a greater quantity and significant statistical difference. Collagen fibers showed improved organization and arrangement on the 11th day for LG. **Conclusion:** Our results show that FBM is effective in helping the kinetics of the cutaneous wound healing process in rats and promotes the necessary stimuli for the satisfactory evolution of healing process, ultimately leading to structurally desirable tissue.

**KEYWORDS:** Collagen, GaAlAs Laser, Photobiomodulation, Wound Repair

## 5.1 Introdução

Feridas cutâneas são definidas como interrupções do tecido cutâneo-mucoso que promovem alterações consideráveis em sua estrutura anatômica e/ou na função fisiológica; e dependendo da gravidade do acometimento, evoluem para índices consideráveis de morbidade e mortalidade [1-3]. Atualmente não há estimativas confiáveis sobre a prevalência e a incidência das feridas crônicas, uma vez que este termo engloba diferentes tipos de lesões cutâneas, com diversas classificações e categorias [4,5].

O processo de cicatrização de lesões cutâneas é considerado um evento complexo dividido em fases distintas e sobrepostas, denominadas de inflamação, proliferação e remodelação [2,6,7]. A fase inflamatória, que corresponde do início da lesão até aproximadamente 4 dias, é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos e citocinas inflamatórias, em particular o TNF- $\alpha$ , responsável em estimular os queratinócitos, macrófagos e fibroblastos, além de atuar na expressão de fatores de crescimento que contribuem para angiogênese e síntese de colágeno [8]. Na fase proliferativa que perdura de 5 a 14 dias [9-10] são observados eventos relacionados ao restabelecimento endotelial vascular pela angiogênese, além de formação da matriz extracelular (MEC) e epitelização [2,11-12]. A fase de remodelamento inicia-se após 10 dias decorrentes da lesão e pode persistir por meses dependendo da extensão e profundidade da ferida [12]. Sua característica principal é o remodelamento do colágeno, em que as fibras se tornam espessas, resistentes e organizadas, sendo as ligações químicas covalentes cruzadas as responsáveis diretamente por sua maturação [8-9].

Considerando os mecanismos envolvidos na remodelação dos tecidos após a lesão, bem como as propriedades biofísicas do ambiente celular, a fotobiomodulação (FBM) tem sido utilizada com sucesso na regeneração de lesões cutâneas [13-16]. Assim, a FBM é indicada como recurso terapêutico capaz de auxiliar o processo de cicatrização de tecidos,

devido aos inúmeros relatos na literatura que comprovam a interação fotobiológica da luz com os tecidos lesados, e com isso, estimulam eventos específicos como modulação da inflamação [14,17], proliferação das células endoteliais por fatores de crescimento como VEGF, e proliferação de fibroblastos com aumento na síntese de colágeno [18-23], sendo tais eventos considerados indispensáveis para a boa evolução do processo de cicatrização.

Além disso, a eficiência da FBM nos mecanismos celulares, seja por vias proliferativas e energéticas, transdução de sinais elétricos, bioquímicos ou atividade imunitária, são diretamente dependentes dos parâmetros empregados, como comprimento de onda eletromagnético, dose, área do feixe de luz, especificidade tecidual, tempo e tipo de lesão [24-25]. Sendo assim, é importante ressaltar que a escolha de um protocolo adequado para tratar lesões cutâneas induzidas por instrumentação cirúrgica ainda é um desafio, já que a literatura compara parâmetros distintos em diferentes tipos e tamanhos de lesões, o que dificulta o real entendimento dos mecanismos envolvidos na cinética de evolução do processo como um todo.

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da FBM na cinética do processo de cicatrização de lesões cutâneas induzidas no dorso de ratos, e com isso explorar melhor os mecanismos fotobiológicos acionados pela fototerapia neste tipo de lesão.

## **5.2 Materiais e Métodos**

### **5.2.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, adultos, aproximadamente 250 a 300g, mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, em um total de 16 dias, sendo alocados individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com livre acesso a água e ração apropriada. Este estudo foi submetido e

aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar, nº 2-007/2014. Os animais foram divididos de modo aleatório em dois grupos (n=10):

- Grupo Controle (GC): Realização das feridas e simulação da FBM;
- Grupo Laser (GL): Realização das feridas e tratamento com FBM;

### 5.2.2 Procedimento Cirúrgico

Para a realização das feridas os animais foram previamente pesados e anestesiados por Ketamina (40 mg/kg, Agener, SP, Brazil) e Xilasina (15 mg/ kg, Dopaser, SP, Brazil). Em seguida os animais foram mantidos em decúbito ventral, para a tricotomia digital da região dorsal. Posteriormente, foi realizada três lesões por *punch* dermatológico de 10mm de diâmetro com lâmina circular compreendendo todas as 3 camadas da pele, equidistante 1cm entre si, no dorso de cada animal [26], (Figura 8).

As coletas das amostras, ocorreram no 4º, 11º e 16º dia do tratamento, sendo a escolha das feridas dos respectivos dias, determinada de maneira aleatória a cada final de período.



**Figura 8:** Ilustração da realização das três feridas por procedimento cirúrgico utilizando *punch* dermatológico de 10mm (Fonte: Arquivo pessoal).

### 5.2.3 Tratamento por Fotobiomodulação

A FBM foi realizada com um laser vermelho (LASERPULSE, IBRAMED, Brasil), comprimento de onda de 670nm, potência de saída de 30mW, densidade de energia 14,28 J/cm<sup>2</sup> e área transversa do feixe de 0.063cm<sup>2</sup>. O equipamento foi calibrado previamente ao início do experimento no Instituto de Física da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP) por um técnico qualificado. A aplicação iniciou-se uma hora após a indução da lesão, e decorreu com aplicações diárias efetuadas em um único ponto posicionado perpendicularmente ao dorso do animal, de modo contínuo, com o feixe de luz abrangendo toda a área da ferida totalizando ao final; 3, 10 e 15 aplicações de acordo com os tempos experimentais avaliados. O GL recebeu a FBM ininterruptamente, até o momento em que ocorreu a coleta da amostra em cada tempo experimental proposto, ou seja, 4º, 11º e 16º dias. No momento do tratamento, os animais foram imobilizados por uma manta de algodão que serviu de auxílio tanto para a aplicação da terapia quanto para minimizar o estresse ocasionado ao animal. O GC recebeu aplicação da FBM de modo simulado. Os parâmetros detalhados da FBM estão expressos na tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM.

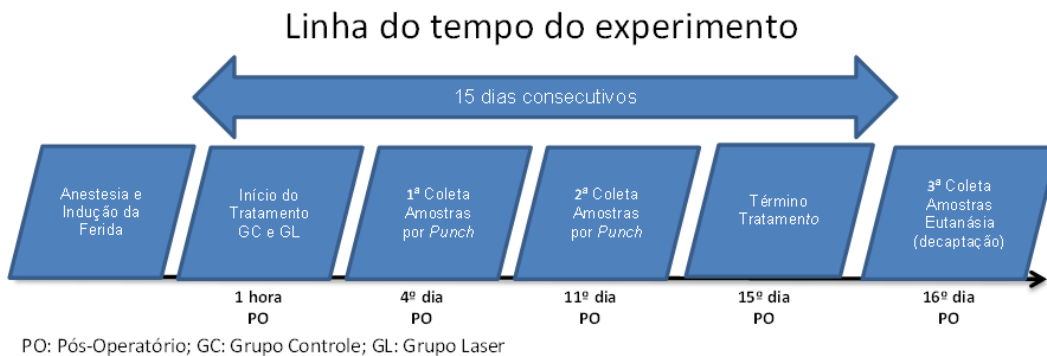
	<b>Comprimento de Onda (nm)</b>	<b>Potência (mW)</b>	<b>Densidade de Energia (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia Total (J)</b>
<b>GC</b>	670	30	-	30	-
<b>GL</b>	670	30	14,28	30	0.9

### 5.2.4 Coleta das amostras

As amostras de tecido foram coletadas utilizando *punch* dermatológico com área total de 10mm, no 4º, 11º e 16º dia do tratamento. A escolha da amostra coletada em cada período experimental foi determinada de maneira aleatória a fim de evitar risco de viés.

### 5.2.5 Eutanásia

Os animais sofreram eutanásia, por decapitação com guilhotina, no 16º dia após a realização da ferida cirúrgica.



**Figura 9:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise.

### 5.2.6 Análise Histopatológica

Imediatamente após a coleta da amostra para análise, foi realizado corte longitudinalmente do tecido (tendo como referencia o eixo craniocaudal do animal, abrangendo tanto o centro como a margem inicial da ferida e parte do tecido sadio) com bisturi, sendo fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e após, mantido em álcool 70% e processado para inclusão em parafina. Para a confecção das lâminas as amostras de tecido foram seccionadas em 5µm de espessura.

Foram obtidas três secções de cada amostra, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck) e analisadas. A avaliação histopatológica foi realizada utilizando um microscópio de luz (Zeiss Axioshop, Carl Zeiss, com objetiva 20X), sendo avaliada a reepitelização do tecido e a expressão do colágeno pela análise semiquantitativa, considerando os valores de 0-4, descrito na tabela 5 [27]. A expressão do infiltrado inflamatório foi analisada pela avaliação semiquantitativa através de escores segundo Camacho-Alonso (2007), considerando os valores de 0-4, descrito na tabela 6. Todas as análises foram realizadas por três avaliadores que foram cegados em relação aos grupos experimentais.

**Tabela 5:** Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa da reepitelização do tecido e expressão do colágeno em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

<b>Escala</b>	<b>Reepitelização</b>	<b>Expressão Colágeno</b>
<b>0</b>	Ausente	Ausente-TG
<b>1</b>	Espessura das bordas cortadas	Mínimo-TG
<b>2</b>	Migração de células	Leve-TG
<b>3</b>	Conexão da incisão	Moderado-TG
<b>4</b>	Queratinização	Marcado-TG

TG- tecido de granulação

**Tabela 6:** Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

<b>Escala de classificação histopatológica para avaliação de Infiltrado Inflamatório</b>	
<b>1</b>	Inflamação aguda (membrana piógena é formada)
<b>2</b>	Predominância da inflamação aguda difusa (predominância do tecido de granulação)
<b>3</b>	Predominância de inflamação crônica (fibroblastos começando a proliferar)
<b>4</b>	Resolução e cicatrização (redução ou desaparecimento de inflamação crônica, embora persistam células redondas ocasionais)

### 5.2.7 Análise Imunohistoquímica

As amostras foram inseridas em lâminas silanizadas para uma melhor adesão do material biológico estudado e depois mantidos durante 24 h a 37°C. Após a desparafinização e a hidratação, as secções histológicas foram marcadas com uma caneta hidrofóbica e depois lavadas em uma solução tampão enriquecida com Tween duas vezes por 3 min. Após, as secções foram imersas em peróxido de hidrogênio durante 10 minutos e depois lavadas em solução tampão fosfato (PBS) duas vezes em 3 min e, finalmente, foram imersas em peroxidase endógena durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): anticorpo primário policlonal anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:400; fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ): anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:400, e anticorpo primário policlonal anti-colágeno Tipo I (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200. Ambos foram incubados durante 2 h e lavados duas vezes em PBS. Posteriormente as lâminas foram então



submetidos a um anticorpo secundário (IgG anti-coelho) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a uma concentração de 1:200 em PBS durante 30 min.

As imunomarcações do VEGF, TNF- $\alpha$  e colágeno tipo I foram avaliadas quantitativamente pelo *Software Image J 1.37a*.

### **5.2.8 Análise Birrefringência**

Os cortes histológicos corados pelo método do Picrosirius-Red foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica, com objetiva de 20x) para avaliar a organização das fibras colágenas.

Para a realização da análise quantitativa foi utilizado o software ImageJ 1.37a para avaliar a porcentagem de coloração laranja-avermelhado. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes correspondem ao colágeno tipo I.

Três imagens por corte foram capturadas a uma ampliação de 20x (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quadrante) das três camadas da pele. O plugin Color Deconvolution ImageJ foi utilizado para avaliar a porcentagem de coloração vermelha (colágeno) na área da imagem. Este software reconhece as cores da imagem e as decompõe em três cores básicas: azul (colágeno), vermelho e roxo. A análise morfométrica, correspondente à cor roxa, foi medida como a porcentagem dos pixels totais em cada imagem usando *Threshold color* (software ImageJ), conforme descrito por Caetano, 2015.

### **5.2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise foi realizada através do *Software Graph PadPrism 5.0*. Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados.

Para as comparações intra e entre grupos foi utilizado o teste de ANOVA two-way e os pós-testes de Bonferroni. O nível de significância utilizado foi de 5%.

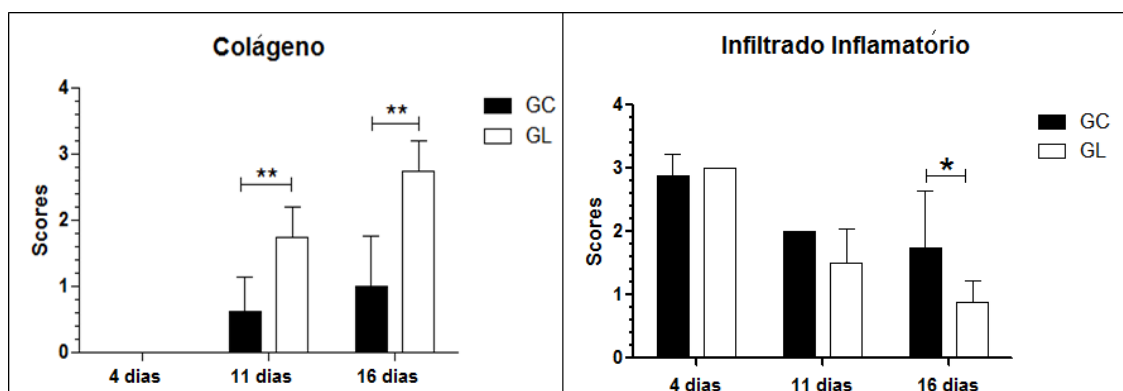
### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Análise Histopatológica

A análise histopatológica mostrou diferenças nas fases do processo de reparo tecidual durante o curso dos dias de tratamento entre os grupos experimentais.

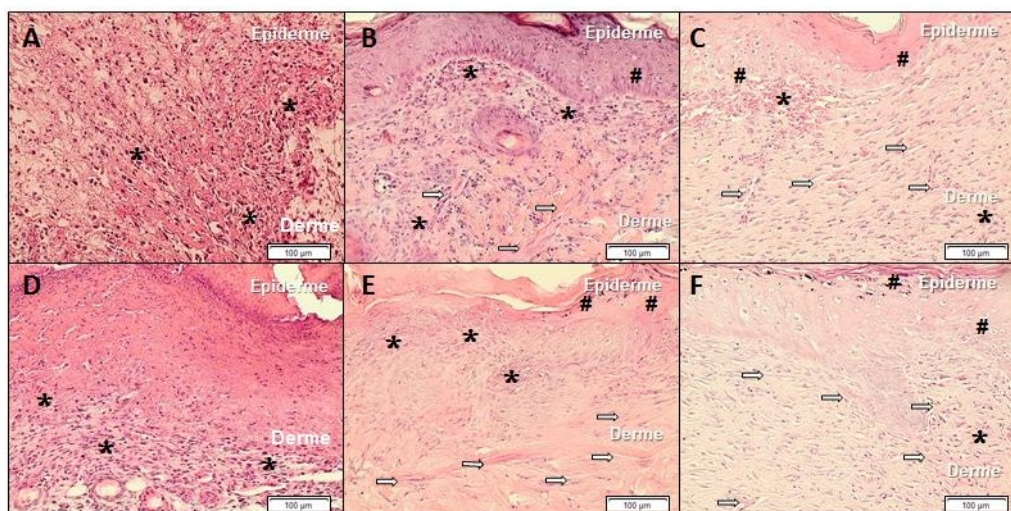
Em relação à análise histopatológica para a expressão do colágeno tipo I, apresentou-se diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre os grupos GC e GL em 2 momentos ao longo do tratamento, no 11º e 16º dia, sendo observado para o GL um aumento leve no 11º dia de tratamento e, um aumento moderado no 16º dia de tratamento em relação ao GC, caracterizando um estágio mais adiantado no processo de reparação tecidual para o GL (Figura 10).

Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) para a quantidade de infiltrado inflamatório que foi menor para o GL em relação ao GC no 16º dia de tratamento (Figura 10).



**Figura 10:** Avaliação quantitativa da análise histopatológica dos valores de expressão do colágeno e infiltrado inflamatório para os GC (grupo controle), e GL (grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5%.

A análise semi-quantitativa relacionada aos valores de reepitelização da ferida evidenciou que o GL apresentou predominância de conexão da incisão e queratinização no 16º dia de tratamento, de acordo com o descrito por Solmaz (2016), concordando com os achados da análise descritiva, em que a comparação entre os grupos evidenciou que o GL encontra-se em um estágio mais avançado de reparação tecidual ilustrado na Figura 11.



**Figura 11:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes ao infiltrado inflamatório, expressão de colágeno e reepitelização da ferida. A: GC-4 (grupo controle no 4º dia); B: GC-11 (grupo controle no 11º dia); C: GC-16 (grupo controle no 16º dia); D: GL-4 (grupo laser no 4º dia); E: GL-11 (grupo laser no 11º dia); e F: GL-16 (grupo laser no 16º dia); (n=10). Os símbolos seta branca, # e \* indicam a expressão de colágeno tipo I, a reepitelização da ferida e a presença de infiltrado inflamatório respectivamente (100x).

### 5.3.2 Análise Imunohistoquímica

#### Imunoexpressão do fator VEGF

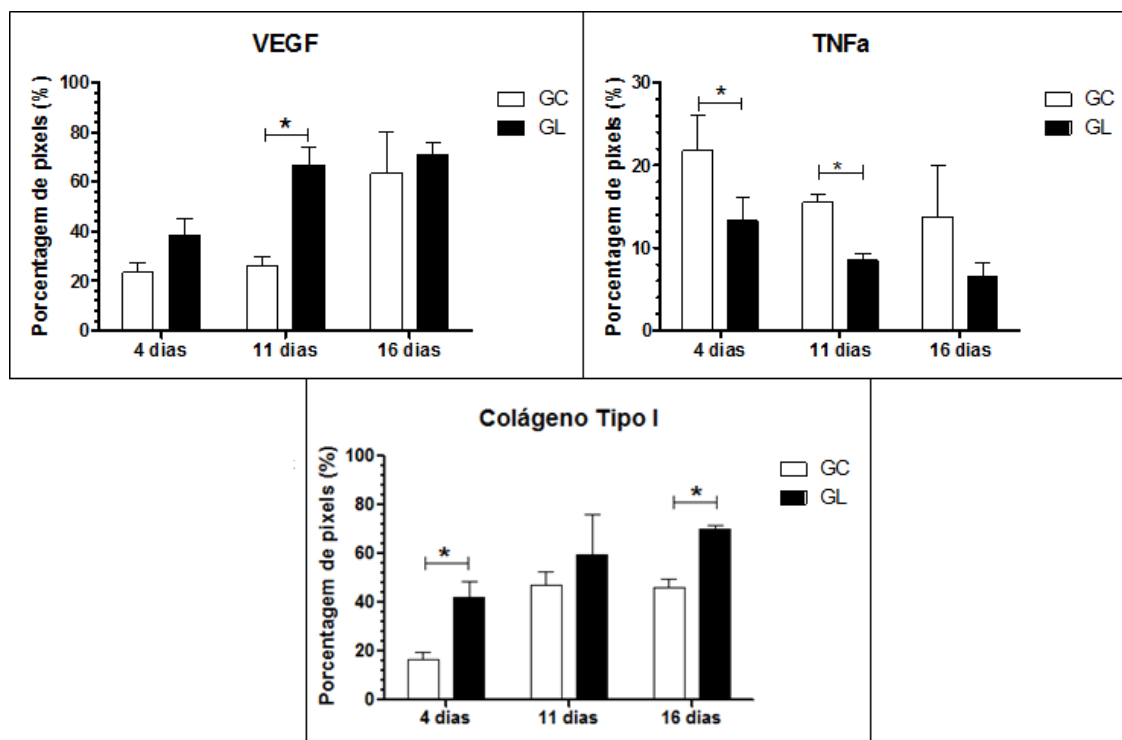
Em relação ao fator VEGF, sua análise foi avaliada pela expressão da cor acastanhada, observando-se que no 11º dia o GL apresentou diferença significativa (5%) com maior imunomarcagem, quando comparado ao GC (Figura 12).

### Imunoexpressão do fator TNF-a

Os resultados obtidos da imunoexpressão do TNF-a apresentaram diminuição dos valores para o GL durante o período de tratamento, sendo observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os GC e GL no 4º e 11º dia (Figura 10).

### Imunoexpressão do Colágeno tipo I

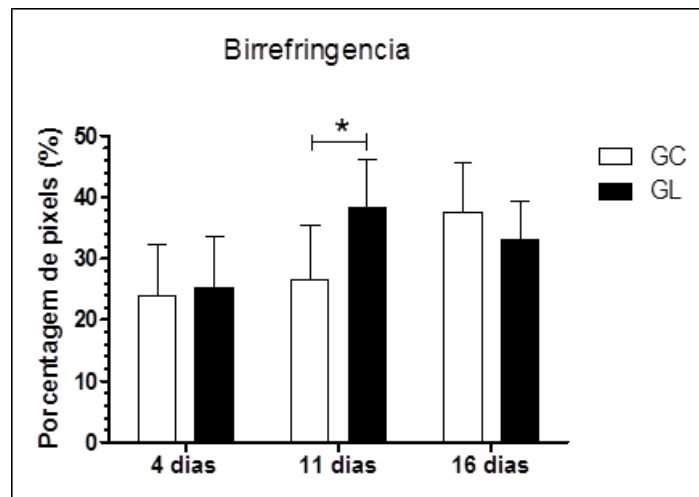
Em relação à imunoexpressão do colágeno tipo I, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apresentando aumento no 4º e 16º dia de tratamento para o GL (Figura 12).



**Figura 12:** Análise quantitativa da imunoexpressão do VEGF, TNF-a e Colágeno tipo I para os GC (grupo controle), e GL (grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5%.

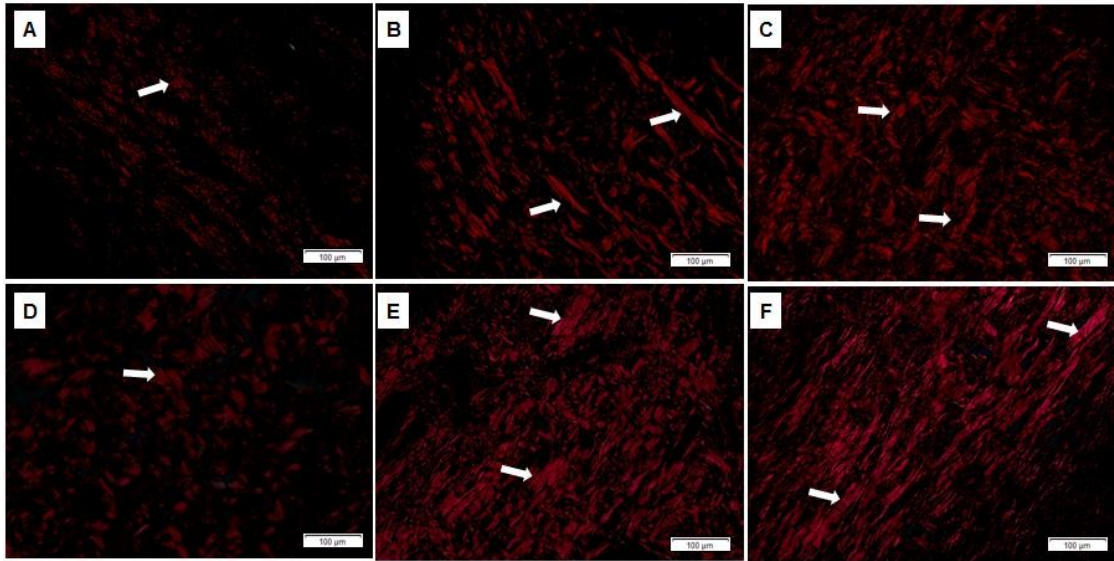
### 5.3.3 Análise Birrefringência

A análise da porcentagem das fibras de colágeno apresentou no 11º dia do tratamento maior quantidade e diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) para o GL em relação ao GC (Figura 13).



**Figura 13:** Análise quantitativa da birrefringência para os GC (grupo controle), e GL (grupo Laser) no 4º, 11º e 16º dia de tratamento após a lesão, com nível de significância de \*5%.

Em relação à organização das fibras colágenas, é possível observar que no 11º dia de tratamento houve uma melhor organização e arranjo para o GL em relação ao GC, sendo que no 16º dia esta organização de fibras intensifica ainda mais, podendo indicar um avanço do processo de reparação tecidual (Figura 14).



**Figura 14:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes à birrefringência das fibras colágenas da ferida. A: GC-4 (grupo controle no 4º dia); B: GC-11 (grupo controle no 11º dia); C: GC-16 (grupo controle no 16º dia); D: GL-4 (grupo laser no 4º dia); E: GL-11 (grupo laser no 11º dia); e F: GL-16 (grupo laser no 16º dia); (n=10). As setas brancas indicam a fibra de colágeno (100x).

#### 5.4 Discussão

Os resultados do presente estudo mostram que a utilização da FBM no comprimento de onda 670nm, 30W e densidade de energia 14,28 J/cm<sup>2</sup> fornece estímulos positivos para a cinética de evolução do processo de cicatrização de feridas cutâneas. Apesar de a literatura demonstrar diversas evidências sobre os efeitos promovidos pela FBM, sabe-se que existem ainda controvérsias sobre a padronização do melhor protocolo a ser utilizado em lesões cutâneas de ordem cirúrgica, já que observamos a comparação de tais protocolos em feridas distintas com diferentes graus de acometimento e gravidade [19-20, 22, 30-32].

Recentes estudos que investigam os efeitos da FBM em lesões cutâneas, enfatizam que a luz laser é capaz de acelerar o processo de reparo tecidual, gerando modificações no

ambiente celular que ocasionam modulação da inflamação, melhora da angiogênese, aumento da síntese de colágeno, e reepitelização [13,16,24,33-36].

Os resultados histopatológicos encontrados em nosso estudo revelam que o laser tem ação direta na modulação da inflamação, pois demonstrou no 16º dia de tratamento uma significativa redução nos níveis de infiltrado inflamatório com diminuição da expressão do TNF- $\alpha$ , quando comparado ao controle. Além disso, vale ressaltar que a presença do TNF- $\alpha$  em tempos tardios do processo de cicatrização, indica um possível mecanismo de degradação do colágeno, o que prejudicaria o resultado final do reparo, e sendo assim, a redução e/ou modulação de sua atuação é algo benéfico a ser considerado. Ainda sobre a influência da FBM na fase inflamatória, nossos achados corroboram com outros estudos que também identificaram a modulação da inflamação decorrida após o tratamento com a FBM em tecidos cutâneos, o que sugere que este recurso é capaz de antecipar a resolução desta fase, desde suas primeiras aplicações, beneficiando posteriormente as fases subsequentes [37-39].

A angiogênese, por sua vez, é um evento crítico e complexo, coordenado por fatores de crescimento específicos associados aos componentes da matriz extracelular, e dependentes da formação do tecido de granulação e do ambiente microvascular. O VEGF é o fator de crescimento predominante com atividade biológica específica que delibera os eventos da cascata celular responsáveis pelo restabelecimento vascular. Estudos vêm investigando a ação da FBM na indução da expressão do VEGF em diversas condições e lesões [13-14, 24,32,34].

Brassolatti et al. (2016), utilizando um laser (660 nm, 100 mW e 25J/cm<sup>2</sup>) observaram tanto a maior presença de novos vasos na camada da nova derme, como o aumento relativo da expressão do fator VEGF. Rennó et al. (2011) utilizando um laser 660nm, 100 mW, porém com menor fluência (0,5 J/cm<sup>2</sup>), também relataram que os seus resultados foram favoráveis na imunoexpressão precoce do fator VEGF, com conseqüente melhora na angiogênese.

Por sua vez, Colombo et al. (2013), investigaram o processo de angiogênese em feridas cutâneas induzidas no dorso de ratos tratados com laser (660 nm, 16 mW, 10 J/cm<sup>2</sup>), e concluíram que a luz laser contribui positivamente aumentando a angiogênese. Nossos achados corroboram com os estudos prévios apresentados, uma vez que encontramos no GL uma maior porcentagem na expressão do VEGF quando comparado ao GC.

Além disso, é importante destacar que este fato foi evidenciado ao décimo primeiro dia de tratamento, ou seja, a luz laser foi capaz de estimular a liberação de fatores de crescimento, no caso deste estudo em particular o VEGF, no período que compreende a transição entre a fase inflamatória e a proliferativa, corroborando também com os achados de Fiorio et al. (2017), que observaram que a FBM foi capaz de estimular a maior liberação do VEGF ao sétimo dia de tratamento. Diferentemente, Szymanska et al. (2013), em seu estudo onde avaliaram os efeitos da FBM na proliferação endotelial e expressão do fator VEGF, observaram que a luz laser estimula a proliferação endotelial, porém com diminuição do VEGF.

Interessantemente a angiogênese além de restabelecer o nível de oxigênio e nutrientes para o tecido recém-formado, deliberando uma alta demanda metabólica, pode favorecer diretamente a síntese proteica, por estar interligado aos processos de proliferação e migração celular, que compreende a presença dos fibroblastos, responsáveis em sintetizar o colágeno [42].

Dos fatores avaliados na fase proliferativa, enfatizamos que a síntese de colágeno, proteína chave para o restabelecimento e elasticidade da nova derme, é indispensável para o entendimento da cinética de evolução do processo de cicatrização. Sendo assim, sabe-se que a qualidade da síntese está diretamente relacionada tanto aos resultados funcionais quanto estéticos apresentados pelo novo tecido. Com isso, a observação de desequilíbrios torna-se essencial, pois quaisquer intercorrências como formações excessivas tanto de matriz



extracelular quanto de fibras desorganizadas, podem evoluir para quadros de aderências teciduais significativas, que impedem o bom funcionamento fisiológico do local [42]. Portanto, reforça-se o fato da avaliação não somente da quantidade de fibras presentes no local, mas sim, da qualidade em que estas fibras se dispõem no ambiente da derme em formação.

Gonçalves et al., 2013 relatam que a maturação do colágeno e seu rearranjo são etapas cruciais que atingem diretamente a resistência mecânica do novo tecido. Isso ocorre com o remodelamento e substituição gradual do colágeno pré-formado Tipo III para colágeno tipo I, gerando aumento nas interações moleculares entre as fibras neoformadas. Meireles et al., 2008, relatam que esta maturação pode ser observada com 21 dias de tratamento quando a fluência utilizada for 20 J/cm<sup>2</sup>. Brassolatti et al., 2016 relata encontrar uma diferença na síntese de colágeno ao décimo dia de tratamento, evidenciando uma síntese precoce com melhora na organização estrutural das fibras, quando a ferida recebeu o tratamento com luz laser.

Diante dos resultados apresentados, é pertinente ressaltar que a FBM é eficaz em auxiliar a cinética do processo de cicatrização de feridas cutânea em ratos. Todos os eventos biológicos avaliados demonstram uma importante interligação que sugerem que os benefícios da FBM estão dispostos desde a modulação da inflamação até o restabelecimento do novo tecido, contribuindo de maneira efetiva em eventos primordiais como a proliferação e diferenciação celular, com conseqüente aumento e qualidade estrutural do colágeno.

## **5.5. Conclusão**

Com isso, conclui-se que o protocolo de FBM utilizado neste estudo promoveu os estímulos necessários para que o processo de cicatrização evoluísse com qualidade e de

maneira satisfatória, proporcionando ao final, um tecido considerado estruturalmente desejável.

### **Agradecimento**

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV) pelo suporte a este projeto de pesquisa.

### **5.6 Referencia Bibliográficas**

1. Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127:514–525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299434>
2. Reinke JM & Sorg H (2012) Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res* 49:35–43 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797712>
3. Buchanan PJ, Kung TA, Cederna PS (2014) Evidence-Based Medicine: Wound Closure. *Plastic and Reconstructive Surgery* 134(6):1391-1404. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415102>
4. Graves N, Zheng H (2014) The prevalence and incidence of chronic wounds: a literature review. *Journal of the Australian Wound Management Association* 22(1):4-19 <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=272162994803134;res=IELHEA>
5. Jarbrink K, Ni G, Sönnnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, Car J (2016) Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 8;5(1):152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609108>
6. Martin P (1997) Wound healing – Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989>
7. Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 25:9–18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276196>

8. Childs DR, Murthy AS (2017) Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am* 97(1):189-207 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894427>
9. Enoch S, Leaper DJ (2005) Basic science of wound Healing. *Surgery* 23(2):37-42 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931906700679>
10. Muzzarelli RAA, 2009 Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76:167–182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852840/>
11. Broughton G, Janis JE, Attinger CE (2006) Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7 Suppl):1e-S-32e-  
[Shttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168017500](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168017500)
12. Chow O & Barbul A (2014) Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Advances in wound care*, 3(1): 46-53 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761344>
13. Ezzati A, Bayat M, Khoshvaghti A (2010) Low-level laser therapy with a pulsed infrared laser accelerates second-degree burn healing in rat: a clinical and microbiologic study. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(5):603-611 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860542>
14. Guirro ECO, Montebelo MIL, et al (2010) Effect of Laser (670 nm) on Healing of Wounds Covered with Occlusive Dressing: A Histologic and Biomechanical Analysis. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(5):629–634. <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/15250>
15. Hussein AJ, Alfars AA, Falih MAJ, Hassan A-NA (2011) Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *North Am J Med Sci* 3: 193-197 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540090>
16. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MCD, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LRS, Moreira FMA, Parizotto NA (2016) Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microscopy Research and Technique* 79:313-320. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853699>
17. Bayat A, Arscott G, Ollier WE, McGrouther DA, Ferguson MW (2005) Keloid disease: clinical relevance of single versus multiple site scars. *Br J Plast Surg*, 58(1):28-37 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629164>

18. Kubota J (2004) Defocused diode laser therapy (830 nm) in the treatment of unresponsive skin ulcers: a preliminary trial. *J Cosmet Laser Ther* 6:96–102 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15204000>
19. Gal P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F, Sabo J (2006) Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 24(4):480-488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942428>
20. Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Junior IL, Matos AP (2010) Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(1):17-21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764898>
21. Aust MC et al (2011) Percutaneous collagen induction-regeneration in place of cicatrization? *Journal of Plastic, Reconstructive et Aesthetic Surgery* 64:97-107 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413357>
22. Melo VA, Anjos DC, Albuquerque Júnior R, Melo DB, Carvalho FU (2011) Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 26(2):129-34 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445476>
23. Fortuna T, Gonzales AC, Sá MF, Andrade ZA, Reis SRA, Medrado ARAP (2017) Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in the stages of tissue repair. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29239111/#ft>
24. Bossini, PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Antonio J, et al. (2009). Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers in Medical Science*;24(2):209-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351431>
25. Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho R (2011) Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 26:125-131 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865435>
26. Moreira CF, Cassini-Vieira P, Silva MF, Barcelos LS (2015) Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. , 5(22):1-4 <https://bio-protocol.org/e1661>
27. Solmaz H, Dervisoglu S, Gulsoy M, Ulgen Y (2016) Laser biostimulation of wound healing: bioimpedance measurements support histology. *Laser Med Sci* 31(8):1547-1554 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27371448>

28. Camacho-Alonso F, López-Jounet P (2007) Clinical-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 136:119-124 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210346>
29. Caetano GF, Frade MAC, Andrade TAM, Leite MN, Bueno CZ, Moraes AM, Ribeiro-Paes JT, (2014) Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015 Jul;103(5):1013-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220821>
30. Mendez TMTV, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Nascimento PM, Ramalho LMP (2004) Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. *Journal of Clinical LaserMedicine & Surgery* 22(1):19-25 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117483>
31. Marques ACF et al (2016) Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. *Laser Med Sci* 31(9):1915-1923 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624782>
32. Fiorio FB, Albertini R, Pinto Leal-Junior EC, Camillo de Carvalho PT (2014) Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers in Medical Science*;29(1):313-19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677436>
33. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS (2004) Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* 3:211-216 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872239>
34. Renno ACM, Iwama AM, Shima P, Fernandes KR, Carvalho JG, De Oliveira P (2011). Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*;13(5):237-42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21774661>
35. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR (2013) Low Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32:41-52 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126803/>
36. Hamblin MR (2017) Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 4(3):337–361. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748217>

37. Chen X (2010) Role of TNF- $\alpha$  in Wound Repair in Human Vocal Fold Fibroblasts. *Laryngoscope* 120(9): 1819–1825. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965638/>
38. Mesquita-Ferrari RA et al (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Laser Med Sci* 26(3):335-40 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21053039>
39. Chu YH, Chen SY, Hsieh YL, Teng YH, Cheng Y (2017) Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- $\alpha$ /cycloheximide-induced apoptosis. *Laser Med Sci* <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2364-x> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29098460>
40. Colombo F, Neto AdAPV, Sousa APCd, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRDA (2013). Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. *Brazilian Dental Journal*;24(4):308-12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173246>
41. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, Zalewski P et al (2013) Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol* 64(3):387–391. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959736>
42. Goncalves RV, Novaes RD, Cupertino MdC, Moraes B, Viana Leite JP, Gouveia Peluzio MdC, et al. (2013). Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers in Medical Science*;28(2):383-90 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22354548>
43. Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL (2008) Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*, 26(1):47-54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248161>

## 6. ESTUDO II:

### **“Ação da fotobiomodulação associado ou não ao retinol no processo inflamatório de feridas em ratos”**

Abaiza Nicoletti Otterço<sup>1,2</sup>, Patrícia Brassolatti<sup>3</sup>, Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>, Lucimar da Avó<sup>4</sup>, Paulo Sérgio Bossini<sup>5</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1,6,7</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Votuporanga, SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

<sup>5</sup> Núcleo de Pesquisa e Ensino de Fototerapia nas Ciências da Saúde (NUPEN)

<sup>6</sup> Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Uniara, Araraquara, SP, Brasil

<sup>7</sup> Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, São Paulo, SP, Brasil

## Resumo

A cicatrização de feridas envolve um processo biológico complexo dividido em fases específicas. A fotobiomodulação (FBM) é indicada na cicatrização de feridas por meio da estimulação da proliferação de fibroblastos e angiogênese pela diminuição do infiltrado inflamatório. A vitamina A geralmente é usada para favorecer a cicatrização de feridas e acelerar o tecido de granulação saudável. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitamina A tópica e da FBM (670nm) na fase inflamatória de feridas cutâneas. 40 ratos machos Wistar foram alocados em 4 grupos: controle (GC); Grupo Laser (GL), 670nm, 30mW, energia por ponto de 0,9J, irradiando 1 ponto em 30s; Grupo Vitamina A (GVitA); e Grupo Laser mais Vitamina A (GL + GVitA). As feridas foram realizadas cirurgicamente por um *punch* cirúrgico, com 10mm de diâmetro no dorso dos animais e todos os tratamentos foram iniciados uma hora após a realização da ferida. O tratamento durou 4 dias consecutivos e a coleta da amostra foi feita no 4º dia. Foram realizadas análises histopatológicas e imunohistoquímica. Os resultados foram comparados entre os grupos por ANOVA one-way com *post hoc* de Tukey (5%). O infiltrado inflamatório diminuiu significativamente em GL em comparação com GC e GVitA. Em relação à angiogênese, a expressão de VEGF aumentou significativamente nos grupos GL e GL + VitA. A partir dos dados apresentado, foi observado que os tratamentos propostos foram eficazes no processo de cicatrização melhorado por GL e GL + VitA, demonstrando que a FBM associado à Vitamina A favorece a melhora da ferida e pode ter uma aplicação potencial para o manejo clínico de feridas cutâneas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cicatrização de Feridas, Fotobiomodulação, Vitamina A.

## Abstract

Wound healing involves a complex biological process divided into specific phases. The photobiomodulation of laser therapy is indicated in wound healing by stimulating fibroblasts proliferation and angiogenesis by decreasing inflammatory infiltrate. The Vitamin A is usually used to reverse the inhibitory effects on wound healing and accelerates the healthy granulation tissue. The purpose of this study was to evaluate the effect of topical Vitamin A and photobiomodulation by low-level laser therapy (GaAlAs) in inflammatory phase of cutaneous wounds. Forty Wistar male rats were separated into 4 groups: Control (CG); Laser Group (LG) GaAlAs, 670nm, 30mW, energy per point of 0,9J, radiating by 1 point in 30s; Vitamin A Group (VitAG); and Laser Group plus Vitamin A (LG+VitAG). Wounds where



made surgically by a punch biopsy with 10mm of diameter on the back of the animals and them all treatments were started according experimental. The treatment took 4 consecutive days and biopsy was made on the day 4. H&E analysis were performed in addition to immunohistochemistry. The results was compared between-groups by analysis of variance the test one-way ANOVA with post hoc Tukey (5%). Inflammatory infiltrate increased significantly in LG compared to CG and VitAG ( $p<0,05$ ). Regarding angiogenesis, VEGF expression was increased significantly in LG and L+VitAG groups,  $p<0,01$ . Given the results presented, the proposed treatments were effective on the healing process improved by LG and L+VitAG, shown that Laser associated to Vitamin A potentiates enhanced healing by reduced wound area and may have potential application for clinical management of cutaneous wounds.

**KEYWORDS: GaAIIAs laser, Photobiomodulation, Vitamin A, Wound healing**

## 6.1 Introdução

A cicatrização de feridas envolve um complexo processo dividido em eventos biológicos específicos como inflamação, proliferação e remodelamento. A literatura já apresenta evidências em relação aos mecanismos de ação e resposta para cada fase específica [1-3]. Com isso, sabe-se que imediatamente após a ocorrência do trauma inicia-se a fase inflamatória que envolve respostas vasculares caracterizadas por coagulação sanguínea e hemostasia, provocando vasodilatação local, extravasamento de sangue, fluido para o meio extravascular e bloqueio da drenagem linfática, evidenciando os sinais da inflamação. Tais eventos celulares englobam a formação da rede de fibrina que auxiliará a migração de células fundamentais nos processos de fagocitose e quimiotaxia. Neutrófilos e macrófagos são células essenciais que participam desta fase inicial do processo de cicatrização sendo ambos responsáveis por realizar a fagocitose tecidual da área lesada e ainda uma capacidade adicional de liberar fatores de crescimento específicos que participarão das etapas subsequentes [2-4].

As feridas quando não tratadas adequadamente oferecem alto risco de contaminação e podem complicar o bom funcionamento fisiológico, prejudicar a qualidade de vida e gerar altos custos financeiros decorridos tanto por fatores extrínsecos que incluem pressão, função linfática prejudicada, estress mecânico, ou por fatores intrínsecos que incluem imobilidade, infecção, desnutrição, doenças vascular periférica [3].

Devido à complexidade envolvida no processo de regeneração tecidual, diversos recursos como acupuntura [5], produtos farmacológicos [6] e recursos fisioterapêuticos, vêm sendo propostos a fim de auxiliar e/ou estimular as fases do processo de cicatrização, visando otimizar o tempo de tratamento e uma melhor qualidade tecidual. Dentre os recursos fisioterapêuticos podemos destacar a FBM que envolve mecanismos seguros e eficazes em estimular o ambiente da lesão e promover uma resposta positiva do tecido frente à luz absorvida [6-8].

A FBM tem efeitos importantes no processo de cicatrização de feridas, e seu mecanismo biológico básico pode ser descrito pela absorção da luz pelos cromóforos mitocondriais [6,7]. Os efeitos primários da FBM no início do processo de reparo promovem a estimulação da atividade fagocitária dos macrófagos, aumento da proliferação de diversos tipos celulares, maturação e locomoção de fibroblastos e linfócitos, além de estimular as etapas subsequentes de proliferação e remodelamento [8-10]. Sob o ponto de vista vascular, a FBM ativa a proliferação das células endoteliais estimuladas por fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é caracterizado por apresentar múltiplos componentes atuantes na angiogênese, através do aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e o carreamento de substratos específicos [10,11]. Além disso, a FBM promove a modulação da fase inflamatória atuando na expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) que por sua vez converte o ácido aracdônio em prostaglandinas que tem um papel central no processo fisiopatológico e inflamatório [12,13].

Assim como a FBM auxilia o processo de reparação tecidual, tratamentos tópicos vêm sendo investigados para a mesma finalidade como a vitamina A. Por sua vez, a vitamina A possui princípio ativo que estimula a dinâmica da regeneração tecidual, como a formação da matriz extracelular, angiogênese, síntese das fibras de colágeno, fibroplasia, e síntese de glicoproteínas e proteoglicans [14,15]. Sua administração no ambiente lesado pode contribuir para a reepitelização de feridas, pois atua como cofator direto da síntese de colágeno e influencia também a resposta imunológica [15-19], assim como pode prevenir a susceptibilidade às infecções.

Apesar de a literatura demonstrar que tanto a FBM como a vitamina A são recursos, que quando aplicadas de maneiras isoladas, favorecem o processo de regeneração tecidual, a associação de ambas é pouco explorada em estudos científicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, especificamente na fase inflamatória, a ação da FBM isolada e associada à vitamina A, a fim de se elaborar um protocolo eficaz no tratamento de feridas de pele em ratos.

## **6.2 Material e Métodos**

O presente estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Protocolo: 2-007/2014). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar durante todo o período experimental, em um total de 4 dias, sendo alocados individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com livre acesso a água e ração apropriada.

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, machos, com 250 a 300 gramas, divididos de modo aleatório em quatro grupos (n=10):

- Grupo Controle (GC): Realização das feridas e simulação da FBM;
- Grupo Laser (GL): Realização das feridas e tratamento com FBM;
- Grupo Vitamina A (GVitA): Realização das feridas com aplicação de loção tópica com Vitamina A;
- Grupo Laser + Vitamina A (GL+VitA): Realização das feridas e tratamento com FBM (670nm, 30mW, 15J/cm<sup>2</sup>) + aplicação de loção tópica com Vitamina A.

### 6.2.1 Procedimento Cirúrgico

Para a realização das feridas os animais foram previamente pesados e anestesiados por Ketamina (40 mg/kg, Agener, SP, Brazil) e Xilasina (15 mg/ kg, Dopaser, SP, Brazil). Em seguida os animais foram mantidos em decúbito ventral, para a tricotomia digital da região dorsal do animal e posterior lavagem com soro fisiológico. Posteriormente, foi realizada uma lesão por um *punch* de 10mm de diâmetro no dorso de cada animal (Figura 15).



**Figura 15:** Ilustração da realização da ferida por procedimento cirúrgico utilizando *punch* de 10mm (Fonte: Arquivo pessoal).

### 6.2.2 Terapia por Fotobiomodulação

Os grupos tratados pela FBM receberam a primeira aplicação uma hora após a cirurgia. No decorrer do experimento, as aplicações foram efetuadas diariamente no período da manhã em um único ponto sobre a lesão, totalizando um máximo de quatro aplicações. O laser foi posicionado de maneira perpendicular e aplicado em modo contínuo, com o feixe de luz abrangendo toda a área da ferida. A FBM foi realizada com um laser vermelho (LASERPULSE, IBRAMED, Brasil), comprimento de onda de 670nm, potência de saída de 30mW e densidade de energia 14,28 J/cm<sup>2</sup>. O equipamento foi calibrado previamente ao início do experimento no Instituto de Física da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP) por um técnico qualificado. Os parâmetros do Laser estão expressos na tabela 7. No momento do tratamento, os animais foram imobilizados por uma manta de algodão para uma melhor aplicação da terapia e evitar o estresse.

**Tabela 7:** Parâmetros detalhados utilizados para o tratamento com a FBM.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Potência (mW)</b>	<b>30</b>
<b>Irradiância(mW/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>0,038</b>
<b>Comprimento de Onda (nm)</b>	<b>670</b>
<b>Modo de ação</b>	<b>Contínuo</b>
<b>Área transversa do feixe (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>0.063</b>
<b>Densidade de Energia (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>14,28</b>
<b>Tempo (s)</b>	<b>30</b>
<b>Nº de pontos de irradiação</b>	<b>1</b>
<b>Energia (J)</b>	<b>0.9</b>

### 6.2.3 Loção tópica com vitamina A

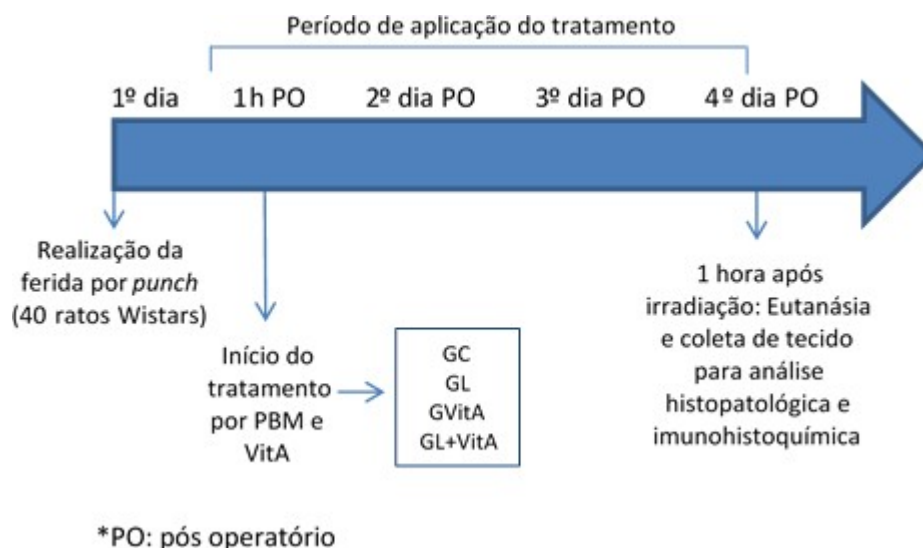
Os grupos tratados com a loção tópica tiveram o início da aplicação uma hora após a realização da cirurgia. Durante o período experimental que totalizou um máximo de quatro aplicações, foi aplicada 5mg da loção sobre a lesão, diariamente, sempre no período da

manhã, sendo espalhada sobre a ferida, de forma que fosse totalmente recoberta. A loção foi composta por 10.000 UI de vitamina A/volume em base de 100g, com elevado teor hidrolipídico (Laboratório Essenziale, Novo Hamburgo, RS-Brasil).

É importante destacar que no grupo GL+VitA, primeiramente foi realizado a FBM e imediatamente após foi aplicada a loção recobrendo toda a área da ferida.

#### 6.2.4 Eutanásia

Os animais sofreram eutanásia, por decapitação com guilhotina, no 4º dia após a realização da cirurgia sendo nesse momento coletada as amostras para posterior análise. A área da ferida delimitada para análise compreendeu corte transversal do material retirado por *punch* de 10 mm, abrangendo tanto o centro como a margem inicial da ferida e parte do tecido sadio. A escolha da eutanásia no 4º dia foi devido à investigação do período inflamatório.



**Figura 16:** Ilustração da linha do tempo envolvendo os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e coleta de material para análise.

### 6.2.5 Análise Histopatológica

As amostras coletadas por *punch* dermatológico da região tanto do centro como margem foram fixadas em formalina 10% e armazenadas em álcool 70%. Para a confecção das lâminas as amostras foram incluídas em parafina e o tecido foi seccionamento em 5µm de espessura.

Foram obtidas três secções de cada amostra, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck) e analisadas. A avaliação histológica foi realizada utilizando um microscópio de luz (Zeiss Axioshop, Carl Zeiss, com objetiva 20X).

Foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório, pela análise semiquantitativa através de escores [20], sendo considerados valores de 0-4, descrito na tabela 8. As análises foram realizadas por três avaliadores foram cegados em relação aos grupos experimentais.

**Tabela 8:** Escala de classificação histopatológica para avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

<b>Escala de classificação histopatológica para avaliação de Infiltrado Inflamatório</b>	
<b>1</b>	Inflamação aguda (membrana piógena é formada)
<b>2</b>	Predominância da inflamação aguda difusa (predominância do tecido de granulação)
<b>3</b>	Predominância de inflamação crônica (fibroblastos começando a proliferar)
<b>4</b>	Resolução e cicatrização (redução ou desaparecimento de inflamação crônica, embora persistam células redondas ocasionais)

### 6.2.6 Análise Imunohistoquímica

As amostras foram inseridas em lâminas silanizadas para uma melhor adesão do material biológico estudado e depois mantidos durante 24 h a 37°C. Após a desparafinização e a hidratação, as secções histológicas foram marcadas com uma caneta hidrofóbica e depois lavadas em uma solução tampão enriquecida com Tween duas vezes por 3 min. Após, as

seções foram imersas em peróxido de hidrogênio durante 10 minutos e depois lavadas em solução tampão fosfato (PBS) duas vezes em 3 min e, finalmente, foram imersas em peroxidase endógena durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): anticorpo primário policlonal anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:400; e ciclooxigenase-2 (COX-2): anticorpo primário anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200. Ambos foram incubados durante 2 h e lavados duas vezes em PBS. Posteriormente as lâminas foram então submetidos a um anticorpo secundário (IgG anti-coelho) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a uma concentração de 1:200 em PBS durante 30 min.

As imunomarcações do VEGF e COX-2 foram avaliadas qualitativa e semiquantitativamente pela média de três pesquisadores, utilizando um microscópio de luz (40x, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha). Para a análise qualitativa foi de acordo com a quantidade da imunomarcação na tonalidade acastanhada encontrada no tecido. Na análise semiquantitativa, foi considerado o escore 1-4, onde (1 ausente, 2 leve, 3 moderado e 4 intenso) [10]. As análises foram realizadas por um patologista especializado de forma cega.

### **6.2.7 Análise Estatística**

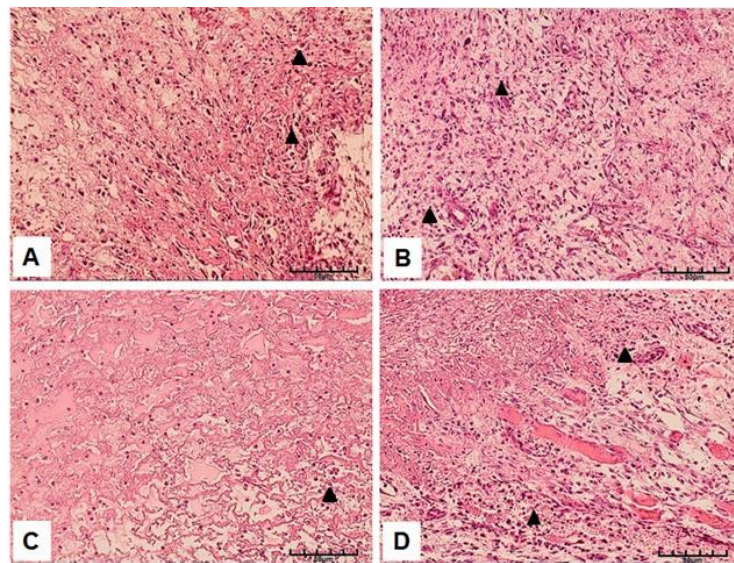
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise dos resultados foi realizada através do *Software* Graph PadPrism 5.0. Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para as comparações entre grupos o teste utilizado foi ANOVA *one-way*. Para as comparações múltiplas foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey com nível de significância de 5%.



## 6.3 Resultados

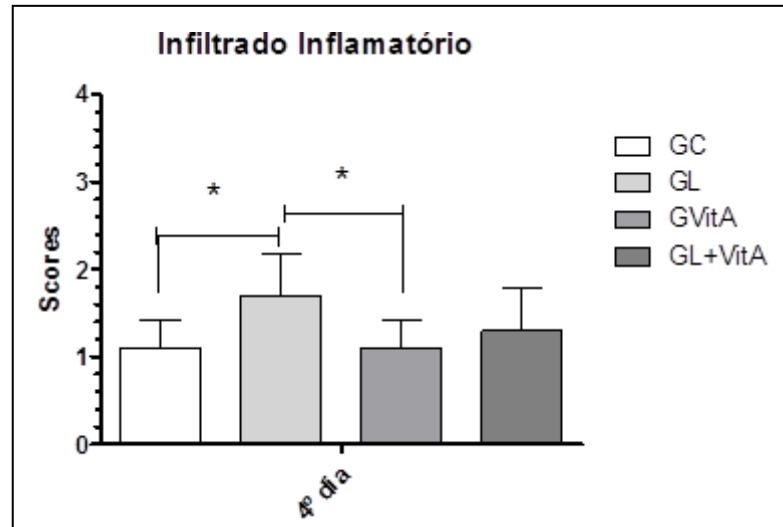
### 6.3.1 Análise Histopatológica

Em relação a análise histopatológica foi observado que os grupos GL e GL+VitA apresentaram menor quantidade de infiltrado inflamatório quando comparado aos demais grupos, com maior ênfase para o GL, caracterizando um estágio mais avançado do processo de reparo. Porém os grupos GC e GVitA apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, o que sugere um estágio de inflamação aguda.



**Figura 17:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes ao infiltrado inflamatório. A: GC (grupo controle); B: GVitA (grupo VitaminaA); C: GL (grupo Laser) e D: GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA) (n=10). Seta preta indica a presença do infiltrado inflamatório (100x).

A análise quantitativa relacionada ao infiltrado inflamatório revelou diferenças significativas que reforçam os achados da análise descritiva, em que a comparação entre os grupos evidenciou que o GL encontra-se em um estágio mais avançado com predominância de inflamação crônica de acordo com o descrito na tabela 8 e ilustrado na Figura 18.



**Figura 18:** Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no 4º dia após a lesão. GC (grupo controle), GL (grupo Laser), GVitA (grupo VitaminaA) e GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA), com nível de significância de \*5% (n=10).

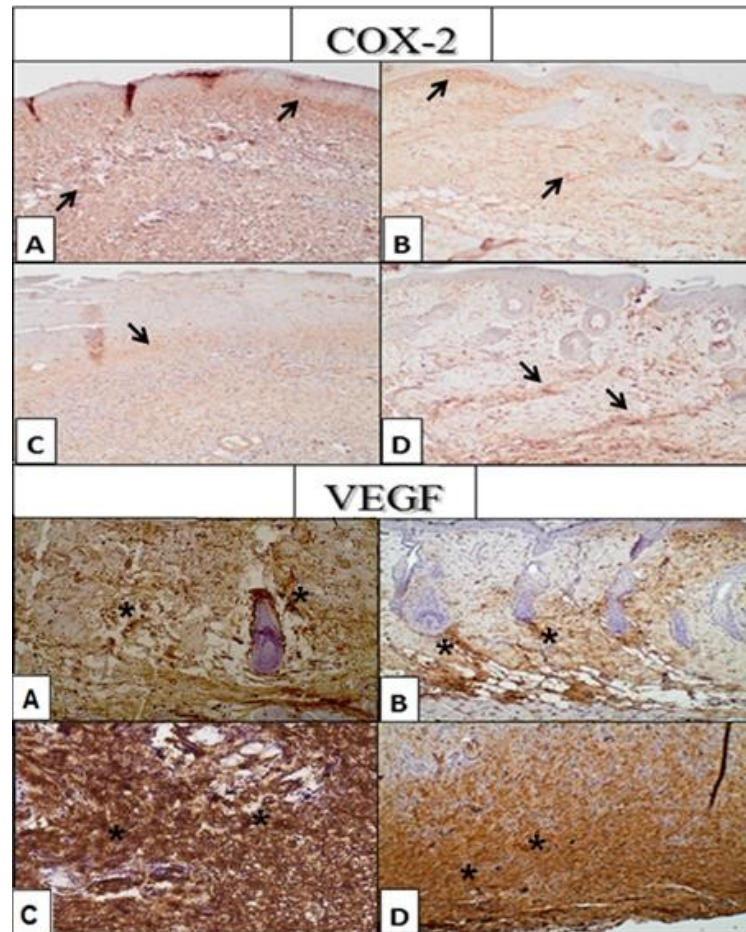
### 6.3.2 Análise Imunohistoquímica

#### Imunoexpressão da COX-2

Os resultados da análise descritiva da expressão da COX-2 por imunomarcção foram avaliados de acordo com a tonalidade acastanhada encontrada no citoplasma de células inflamatórias (Figura 19). A maior imunomarcção da COX-2 foi observada nos grupos GC e GVitA, com uma tendência de diminuição da COX-2 nos grupos GL e GL+VitA, porém não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (Figura 20).

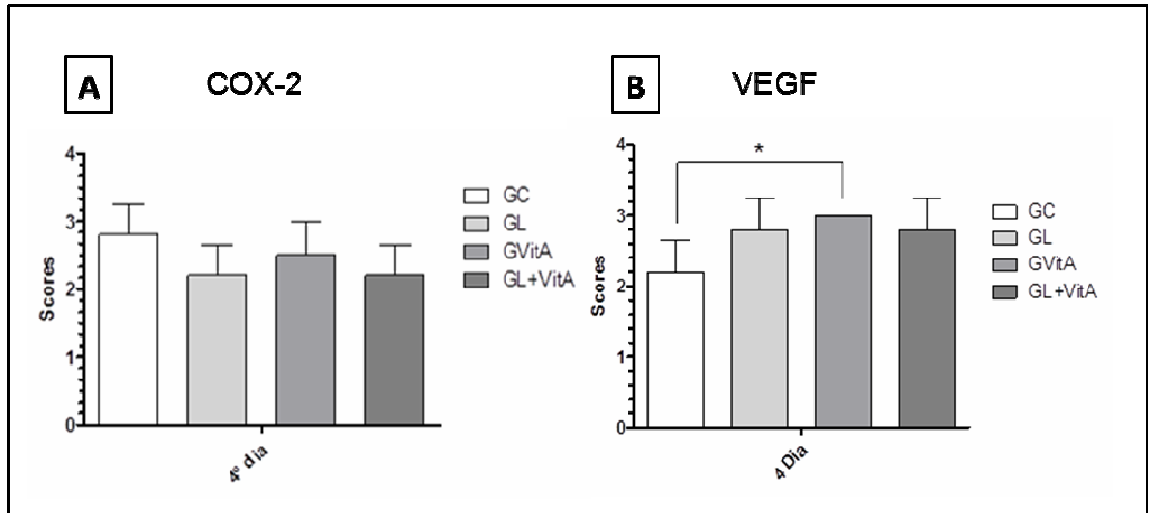
#### Imunoexpressão do fator VEGF

Em relação ao fator VEGF sua análise foi avaliada pela expressão da cor acastanhada, observando-se que os grupos GVitA, GL e GL+VitA apresentaram maior imunomarcção quando comparado ao GC (Figura 19).



**Figura 19:** Análise imunohistoquímica da expressão da COX-2 e do fator VEGF por imunomarcagem no 4º dia de tratamento. A: GC(grupo controle); B: GL(grupo Laser); C: GVitA(grupo VitaminaA) e D: GL+VitA(grupo Laser+VitaminaA). \*indica a imunomarcagem em cor acastanhada onde estão expressos ambos fatores analisados (100x).

Na análise estatística foi observado que somente o grupo GVitA apresentou diferença significativa em relação ao GC, porém os grupos GL e GL+VitA apresentaram uma tendência no aumento da expressão da marcação (Figura 20).



**Figura 20:** Análise semi-quantitativa em A da COX-2 e em B do VEGF, no 4º dia após a lesão. GC (grupo controle), GL (grupo Laser), GVitA (grupo VitaminaA) e GL+VitA (grupo Laser+VitaminaA), com nível de significância de \*5% (n=10).

#### 6.4 Discussão

O presente estudo avaliou a ação da FBM associada, ou não, a vitamina A na fase inicial do processo de reparação tecidual de feridas cirúrgicas, induzidas na pele de ratos e evidenciou diferenças teciduais, estruturais e morfológicas entre os grupos experimentais analisados, que sugerem que cada tratamento forneceu estímulos diferentes no ambiente da lesão.

O processo de reparação de feridas na pele está relacionado a uma série de mecanismos interligados e altamente regulados por sinalizadores celulares, humorais e moleculares, fatores de crescimento e citocinas na matriz extracelular, iniciando o processo de cascata atraindo e ativando fibroblastos, células endoteliais e macrófagos [3,4,21,22]. A FBM proporciona efeitos pró-inflamatórios importante que contribuem diretamente para a adequada evolução do processo. Além disso, é previsto que sua associação, com outros tratamentos, podem intensificar a liberação de fatores importantes e específicos da fase inflamatória [10].

Guirro [23] avaliaram a ação da FBM (670nm, 30mW e 4J e 7J) em feridas de 1cm<sup>2</sup> no dorso de ratos e observaram efeitos positivos no processo de cicatrização de feridas no 7º dia após a lesão, corroborando com nosso estudo em que foram utilizados parâmetros semelhantes sendo também encontrado uma ação pro inflamatória através da FBM, sendo confirmado pelos resultados encontrados, como a diminuição do infiltrado inflamatório e o aumento da expressão do VEGF nos grupos GL, GVitA e GL+VitA. Assim como o estudo realizado avaliando a ação da FBM com um laser de 660nm e potencia de 30mW para a cicatrização de feridas [24], encontrou uma melhora significativa com relação ao estágio inicial da inflamação, quando comparado ao grupo controle.

Em contrapartida um estudo realizado por Mendes [25] em que foram investigados os efeitos da FBM em dois comprimentos de onda distintos (685 e 830nm, 35mW, 20 e 50J/cm<sup>2</sup>) apresentaram resultados negativos quando utilizado o comprimento de onda de 658nm, porém vale ressaltar que as energias aplicadas foram inferiores quando comparado com as utilizadas no presente estudo, sugerindo que tais energias foram insuficientes para estimular os mecanismos celulares no ambiente da lesão.

Embora haja muitos estudos que evidenciem a ação da FBM no reparo de feridas de pele, os protocolos utilizados são diversos com discrepância e falta de detalhamento da parametrização [6,8,10,26-29], além da utilização de diferentes tipos de lesão, o que dificulta a comparação dos resultados e o entendimento do real mecanismo celular envolvido e acionado pela terapia. Com isso, o presente estudo buscou investigar e posteriormente sugerir um novo protocolo de tratamento em que houvesse a associação tanto das propriedades advindas da FBM como dos benefícios encontrados no uso tópico da vitamina A.

A escolha da utilização da vitamina A se deu pelo fato que este composto estimula a formação de nova matriz extracelular, a síntese de proteoglicanos e glicoproteínas [30-32]. Além disso, a vitamina A possui mecanismos bioquímicos que atuam na angiogênese,

podendo potencializar os estímulos já ocasionados pela FBM. Embora os mecanismos envolvendo a ação da vitamina A não sejam totalmente conhecidos, estudos apontam que a suplementação de vitamina A resulta em aumento da interleucina-10(IL-10) e diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), níveis de IgA sérica e proliferação de células mononucleares de sangue periférico melhorando a resposta inflamatória [16,17].

Reinke et al., (2012) analisando os mecanismos da cascata celular na fase inflamatória de feridas no corpo humano relata a ocorrência da degranulação dos macrófagos que contribui para a liberação de diversos fatores de crescimento indispensáveis para a satisfatória evolução do processo de cicatrização, estando entre eles o VEGF. Estudos [11,17,33] relatam sobre o aumento na expressão do VEGF de células epidérmicas dos macrófagos que induz e mantém as etapas angiogênicas precoces pelo 2º ou 3º dia após a lesão corroborando com os achados do presente estudo que também apresentou uma moderada marcação quando este tratamento foi utilizado.

A literatura demonstra que a FBM é um recurso capaz de atuar e beneficiar diretamente o processo da angiogênese, por estimular precocemente a liberação do fator VEGF, que é produzido por queratinócitos no início do processo de cicatrização de feridas [30,34, 35], o que também foi observado nos nossos resultados referentes aos grupos GL e GL+VitA.

Outro fator importante que influencia o processo de reparação tecidual associado à fase inflamatória são os altos níveis de expressão da COX-2 que é liberada em até 12 horas da ocorrência da lesão, atingindo seu pico no terceiro ou quarto dia após o estabelecimento da lesão tecidual [12,13].

O presente estudo avaliou o período do quarto dia após a lesão, onde foi observada a expressão da COX-2 em todos os grupos estudados, correspondendo a sua resposta fisiológica do processo inflamatório [36-40]. Na observação da fotomicrografia, o GC foi o grupo que

demonstrou a maior imunomarcagem em relação aos tratamentos propostos, tanto na forma isolada como associada, surtindo efeitos positivos nesta imunexpressão. Além disso, é necessário destacar que o GL foi o que demonstrou a menor imunexpressão e isso pode estar associado aos efeitos pró-inflamatório proporcionado pela photobiomodulação e descrito previamente por outros autores [4, 35].

Diante do exposto, é pertinente ressaltar que ambos os tratamentos avaliados neste estudo apresentaram características específicas e diferentes capazes de auxiliar e estimular, cada um com suas propriedades, o ambiente celular lesado, especificamente na fase do processo analisado. Pode-se destacar ainda, que os princípios pró-inflamatórios do laser foram observados através das análises da COX-2 e complementarmente seus efeitos estimulantes ao processo de cicatrização devido a maior expressão do VEGF.

Além disso, deve-se mencionar que a vitamina A também desempenhou um papel positivo no ambiente da lesão, pois apresentou uma maior imunexpressão do VEGF com melhor evolução da fase inflamatória quando comparado ao controle. Com isso, é possível sugerir que ambos os tratamentos possuem propriedades isoladas interessantes, e que tais propriedades quando associadas podem se complementar, intensificando o estímulo da neoangiogênese que é um dos efeitos pró-inflamatórios do laser.

Nossos resultados instigam a imaginar que a VitA poderia potencializar tanto a liberação do fator VEGF como os mecanismos celulares envolvidos na angiogênese proporcionados pela estímulo da FBM, porém estudos futuros ainda são necessários para investigar tal fato. Sendo assim, enfatizamos que os tratamentos utilizados tanto isoladamente nos GL e GVitA quanto associados, representados no GL+VitA, proporcionaram efeitos positivos que contribuíram para a melhor evolução da fase inflamatória neste tipo de lesão.

## 6.5 Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi possível supor que os tratamentos promoveram estímulos diferentes, porém benéficos para os mecanismos celulares envolvidos na fase inflamatória. Além disso, vale destacar a observação dos efeitos pró-inflamatórios ocasionados pelo uso da FBM, assim como, a ação da VitA como indutor da neoangiogênese. Com isso, sugere-se que tais tratamentos tanto isolados quando associados promovem efeitos relevantes no ambiente celular que auxilia e até aceleraram os mecanismos envolvidos na resolução da fase inflamatória aguda neste tipo de lesão.

## Agradecimento

Agradecimento ao Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV) pelo suporte a este projeto de pesquisa.

## 6.6. Referência Bibliográficas

1. Martin P (1997) Wound healing – Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989>
2. Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 25:9–18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276196>
3. Reinke JM & Sorg H (2012) Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res* 49:35–43\_ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797712>
4. Buchanan PJ, Kung TA, Cederna PS (2014) Evidence-Based Medicine: Wound Closure. *Plastic and Reconstructive Surgery* 134(6):1391-1404. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415102>
5. Park SI, Sunwoo YY, Jung YJ, et al (2012) Therapeutic Effects of Acupuncture through Enhancement of Functional Angiogenesis and Granulogenesis in Rat Wound Healing. *Evid Based Complement Alternat Med*:464586. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304201>



6. Karu T (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56(5):691-704  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651364>
7. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR (2013) Low Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32:41-52 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126803/>
8. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS (2004) Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* 3:211-216  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872239>
9. Hamblin MR (2017) Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 4(3):337–361.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748217>
10. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MCD, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LRS, Moreira FMA, Parizotto NA (2016) Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microscopy Research and Technique* 79:313-320.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853699>
11. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H (2009) The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res* 153(2):347–358  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027922>
12. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N (2002) Wound Healing Involves Induction of Cyclooxygenase-2 Expression in Rat Skin. *Laboratory Investigation* 82(11):1503-1513 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429810>
13. Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M (2003) Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192:294-306 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575647>
14. Abdelmalek M, Spencer J (2006) Retinoids and Wound Healing. *Dermatol Surg* 32:1219–1230 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17034370>
15. Rojas AI, Phillips TJ (1999) Patients with chronic ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes, and zinc. *Dermatol Surgery* 25:601-604  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491041>
16. Aukrust P, et al (2000) Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation in vivo enhances immunoglobulin

- production and downregulates in inflammatory responses. *European J. of Clinical Investigation* 30:252-259 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692003>
17. Yuen DE, Stratford AF (2004) Vitamin A Activation of Transforming Growth Factor- $\beta$  Enhances Porcine Ileum Wound Healing *In Vitro*. *Pediatric Reserch* 55(6):935-939 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155862>
  18. Paquette D, Badiavas E, Falanga V (2001) Short-contact topical tretinoin therapy to stimulate granulation tissue in chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* 45:382-386 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511834>
  19. Hunt TK (1986) Vitamin A and wound healing. *J Am Acad Dermatol* 15:817-821 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3534019>
  20. Camacho-Alonso F, López-Jounet P (2007) Clinical-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 136:119-124 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210346>
  21. Enoch S, Leaper DJ (2005) Basic science of wound Healing. *Surgery* 23(2):37-42 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931906700679>
  22. Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127:514–525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299434>
  23. Guirro ECO, Montebelo MIL, et al (2010) Effect of Laser (670 nm) on Healing of Wounds Covered with Occlusive Dressing: A Histologic and Biomechanical Analysis. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(5):629–634. <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/15250>
  24. Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho R (2011) Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 26:125-131 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865435>
  25. Mendez TMTV, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Nascimento PM, Ramalho LMP (2004) Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. *Journal of Clinical LaserMedicine & Surgery* 22(1):19-25 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117483>
  26. Kubota J (2004) Defocused diode laser therapy (830 nm) in the treatment of unresponsive skin ulcers: a preliminary trial. *J Cosmet Laser Ther* 6:96–102 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15204000>

27. Gal P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F, Sabo J (2006) Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 24(4):480-488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942428>
28. Broughton II G, Janis JE, Attinger CE (2008) Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7S): 1e-S-32e-S. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801750>
29. Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Junior IL, Matos AP (2010) Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(1):17-21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764898>
30. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, and Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246(4935):1306-1309 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479986>
31. Buchanan PT, Gilman RH (2016) Retinoids: Literature Review and Suggested Algorithm for Use Prior to Facial Resurfacing Procedures. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 9(3):139-144 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27761082>
32. Bilgili I SG, Calka O, Akdeniz N, Bayram I, Metin A (2013) The effects of retinoids on secondary wound healing: Biometrical and histopathological study in rats. *J Dermatologl Treat* 24(4):283-289 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22646471>
33. Ricciardolo FLM, Sabatini F, Sorbello V, *et al* (2013) Expression of vascular remodelling markers in relation to bradykinin receptors in asthma and COPD. *Thorax* 68(9):803–811 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739138>
34. Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, *et al* (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 9(2):73-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615041>
35. Johnson KE, Wilgus TA (2014) Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in wound care* 3(10):647-661 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183920/>
36. Brassolatti P, Kido HW, Bossini PS, Gabbai-Armelin PR, Otterço AN, Almeida-Lopes L, Zanardi LM, Napolitano MA, Forato LA, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA (2018) Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. *Biomed Mater Eng* 29(1):29-42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254071>

37. Kapoor M, Kojima F, Yang L, Crofford LJ (2007) Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators activated receptor-gamma during normal wound healing: A time course study. *NIH* 76(2):103–112  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239574>
38. Fairweather M, Heit YIH, Buie B, *et al* ( 2015) Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing. *Journal of Surgical Research* 194(2):717-724  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25588948>
39. Blomme EA, Chinn KS, Hardy MM, Casler JJ, *et al* (2003) Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous fullthickness incisional wounds in SKH-1 mice. *Br. J. Dermatol* 148:211-223.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588370>
40. T.A. Wilgus, Y. Vodovotz, E. Vittadini, *et al* (2003) Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen* 11:25-34  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581424>

### **PARTE III**

---

**7. RESULTADOS NÃO SUBMETIDOS – CEGABA**

**8. CONCLUSÕES**

**9. CONSIDERAÇÕES FINAIS / LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

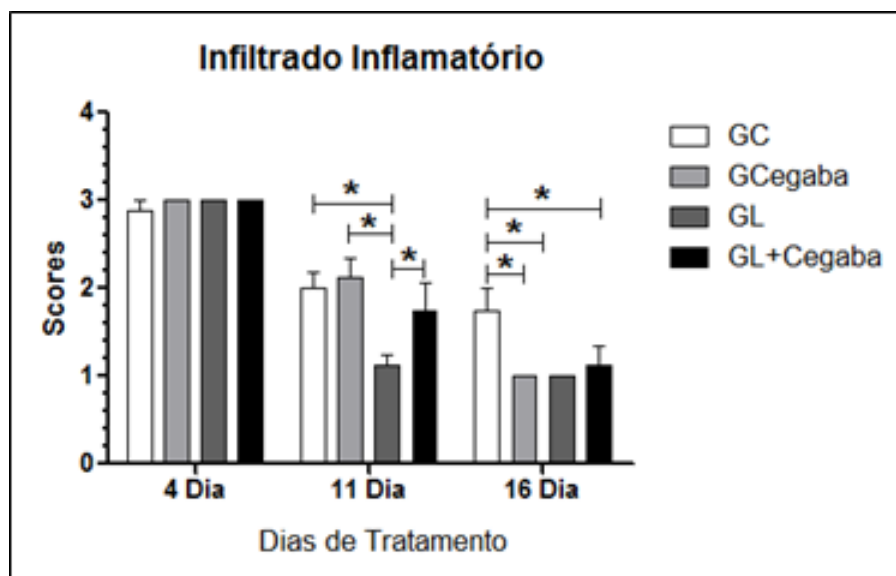
**10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS**

**ANEXOS**

## 7. RESULTADOS NÃO SUBMETIDOS - CEGABA

### 7.1. Análise Histopatológica

Em relação ao infiltrado inflamatório, os resultados obtidos entre os grupos GC, GCegaba, GL, e GL+Cegaba, foram realizados por análise semi-quantitativa através de escores, segundo Camacho-Alonso (2007), que considerou os valores de 0-4. O presente estudo observou que somente o GL apresentou diferença estatística significativa em relação aos GC, GCegaba e GL+Cegaba no 11º dia de tratamento, apresentando diminuição no infiltrado inflamatório, o que sugere um estágio mais avançado do processo de reparo, como ilustra a Figura 21. Observou-se também que no 16º dia todos os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa, com diminuição considerável do infiltrado inflamatório, em relação ao GC (Figura 21).



**Figura 21:** Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no 4º, 11º e 16º dias após a lesão. GC (grupo controle), GCegaba (grupo Cegaba), GL (grupo Laser) e GL+GCegaba (grupo Laser+Cegaba), com nível de significância de \*5% (n=10).

## 7.2. Análise Imunohistoquímica

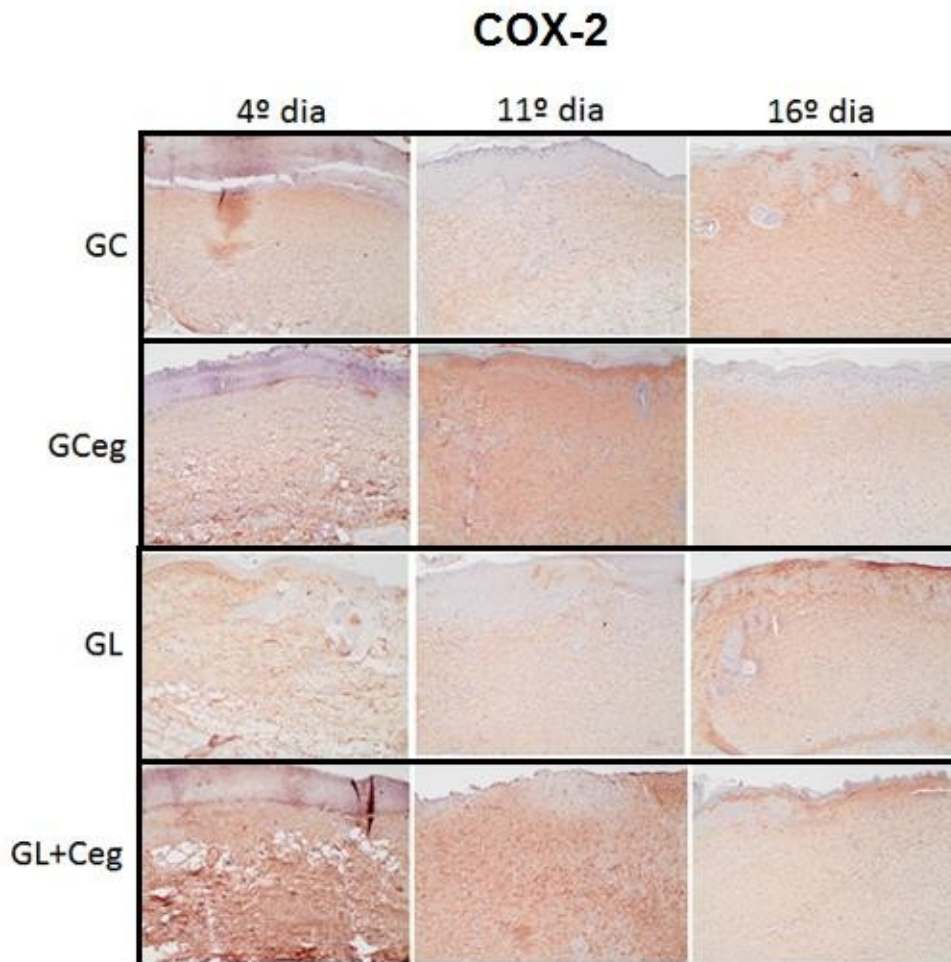
As imunomarcações do VEGF, TNF- $\alpha$  e COX-2 foram avaliadas qualitativa e semiquantitativamente pela média de três pesquisadores, utilizando um microscópio de luz (100x, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha). Para a análise qualitativa foi de acordo com a quantidade da imunomarcação na tonalidade acastanhada encontrada no tecido. Na análise semiquantitativa, foi considerado o escore 1-4, onde (1 ausente, 2 leve, 3 moderado e 4 intenso) (BRASSOLATI, 2016). As análises foram avaliadas por um patologista especializado de forma cega.

As imunomarcações do VEGF, TNF- $\alpha$  e COX-2 foram avaliadas quantitativamente pelo *Software Image J 1.37a*.

### 7.2.1. Imunoexpressão da COX-2

Os resultados da análise descritiva da expressão da COX-2 por imunomarcação foram avaliados de acordo com a tonalidade acastanhada encontrada no citoplasma de células inflamatórias (Figura 22). A imunomarcação da COX-2 foi menos observada para o GL no 11º dia em relação aos demais grupos. No GC houve maior marcação da COX-2 no 16º o que também foi observado no GL para o mesmo período (Figura 22).

Na análise quantitativa observou-se no 11º uma diminuição da expressão de COX-2 para o GL com diferença estatística significativa em relação ao GCegaba e GL+Cegaba (Figura 23).



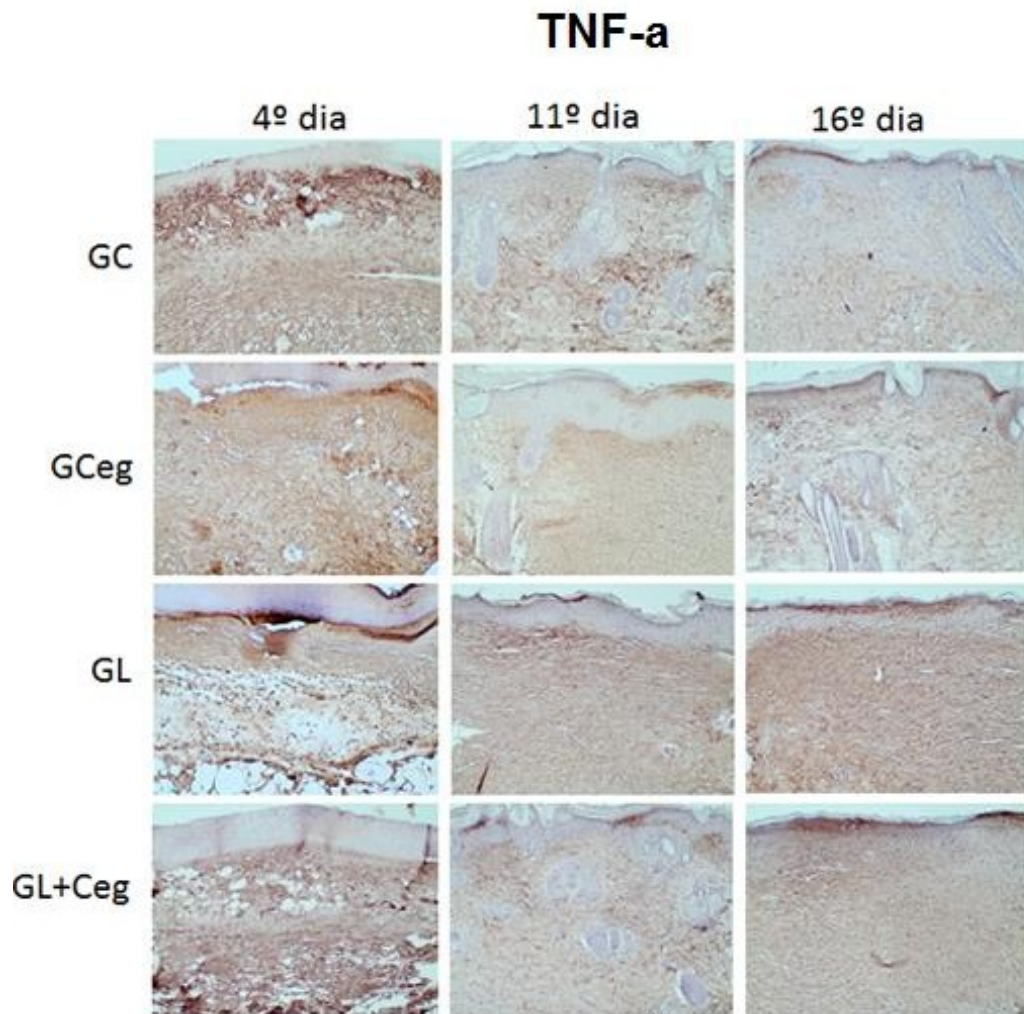
**Figura 22:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão da COX-2 no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x).

### 7.2.2. Imunoexpressão do TNF- $\alpha$

Em relação ao fator TNF- $\alpha$  sua análise descritiva foi avaliada pela expressão da cor acastanhada. Os resultados obtidos da imunoexpressão do TNF- $\alpha$  apresentaram maior expressão no 4º dia de tratamento para todos os grupos do estudo (Figura 23).

Na análise quantitativa do fator TNF- $\alpha$ , no 16º dia de tratamento foi observado diferença estatisticamente significativa (5%) para o GC em relação aos GL e GL+Cegaba (Figura 25).





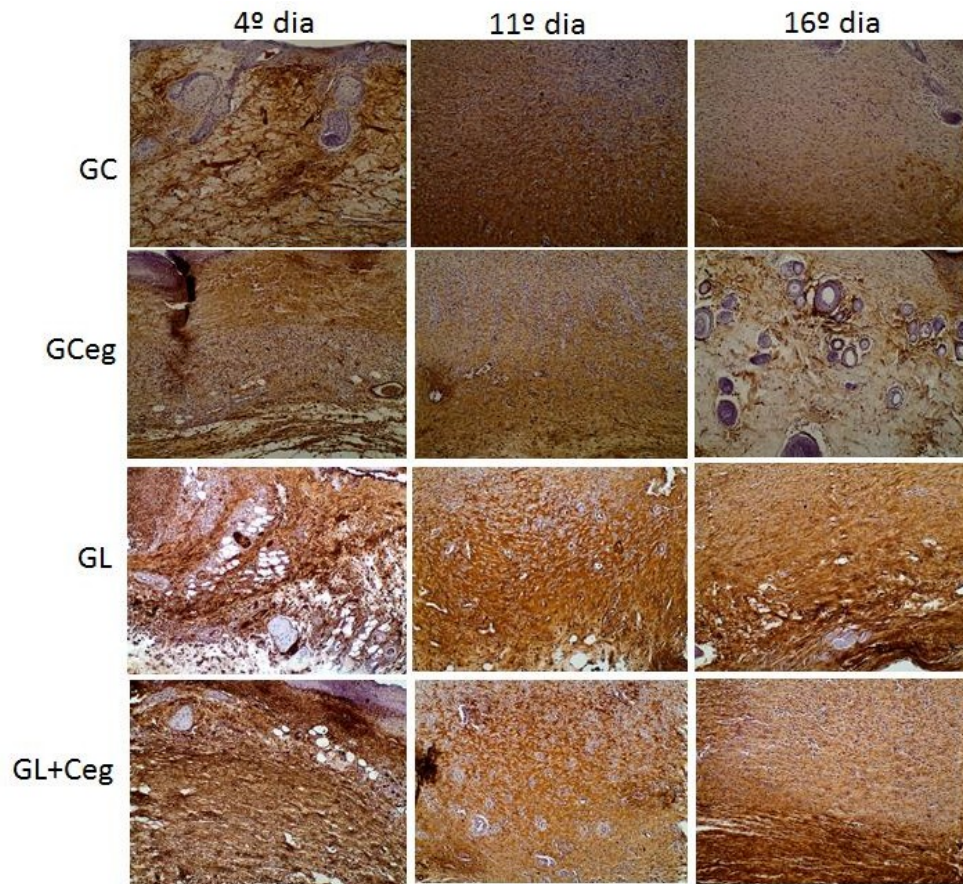
**Figura 23:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão da TNF- $\alpha$  no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x).

### 7.2.3. Imunoexpressão do VEGF

O fator VEGF também foi descrito pela expressão da cor acastanhada. Os resultados obtidos da imunoexpressão do VEGF apresentaram-se, na análise descritiva, com expressão mais marcada para o GL nos 11º e 16º dias e o GC no 11º dia (Figura 24).

Na análise quantitativa do VEGF, no 11º dia de tratamento foi observado aumento do VEGF, com diferença estatisticamente significativa (5%) para o GL em relação a todos os demais grupos estudados. Ainda no 11º dia o GCegaba apresentou menor expressão com

diferença estatística significativa apenas entre o GC. Também foi observado no 16º dia diferença estatisticamente significativa com maior expressão de VEGF para o GL em relação ao GCegaba e GL+Cegaba (Figura 25).



**Figura 24:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais referentes da expressão do VEGF no 4º, 11º e 16º dias de tratamento para os grupos GC(grupo controle); GCeg (grupo cegaba); GL(grupo Laser); GL+Ceg (grupo Laser+cegaba)(100x).

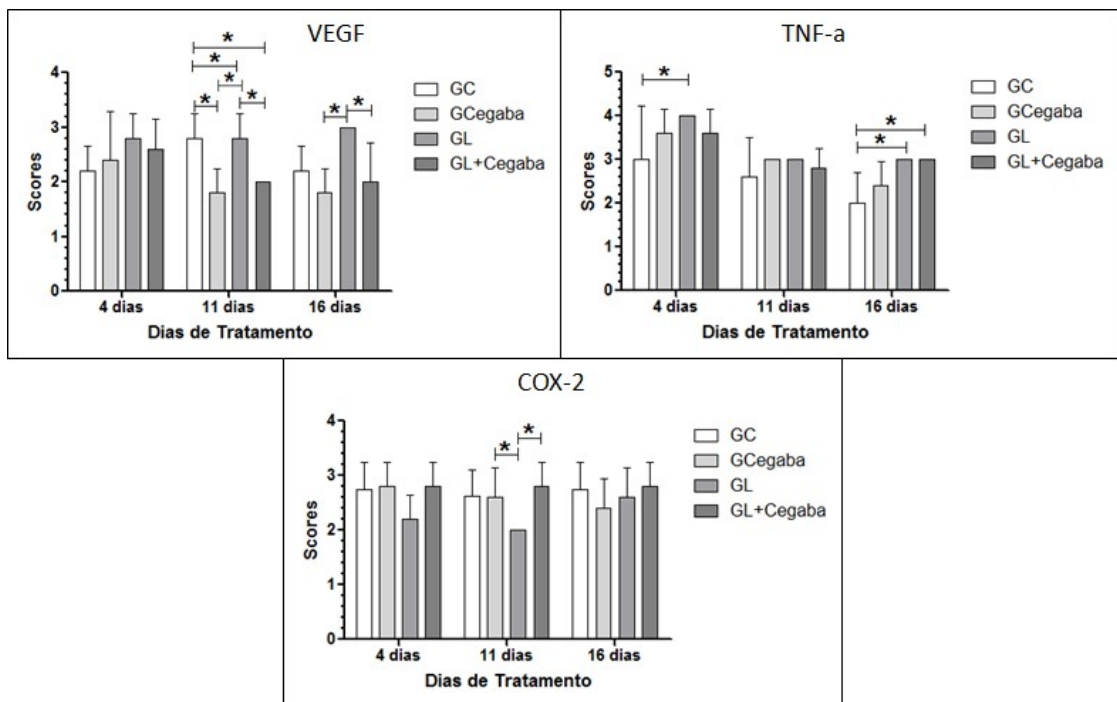


Figura 25: Análise quantitativa da imunoreexpressão do VEGF, TNF-a e COX-2 para os GC (grupo controle), GCegaba (grupo Cegaba), GL (grupo Laser) e GL+GCegaba (grupo Laser+Cegaba), com nível de significância de \*5% (n=10).

## 8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos dos três estudos é possível chegar às seguintes conclusões:

- ✓ A terapia por FBM (670nm) aplicada isoladamente de acordo com o protocolo utilizado promoveu estímulos positivos na evolução do processo de reparo tecidual.
- ✓ A FBM isolada teve ação na modulação da fase inflamatória e proliferativa, no 4º e 11º dias de tratamento, apresentando menor imunomarcagem do fator TNF- $\alpha$ . Para o marcador VEGF apresentou aumento de expressão no 11º dia de tratamento. Em relação à porcentagem das fibras de colágeno tipo I, apresentou maior quantidade no 11º dia de tratamento, e maior imunoexpressão nos 4º e 16º dias de tratamento.
- ✓ A Vitamina A isolada teve ação positiva na modulação da fase inflamatória no 4º dia de tratamento, apresentando aumento da expressão do VEGF.
- ✓ A CEGABA isolada ou associada à FBM não apresentou no presente estudo, evidências de sua ação na modulação das fases de reparação tecidual.
- ✓ A FBM associada à aplicação tópica de Vitamina A apresentou estímulos benéficos para os mecanismos envolvidos na fase inflamatória.

Quanto a perspectivas futuras, novos estudos são importantes para elucidar os mecanismos de ação envolvendo a FBM associada a tratamentos tópicos, uma vez que já é fortemente embasada sua ação isolada, que em muito pode vir a beneficiar a melhor evolução do processo de reparo tecidual.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS / LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Diante dos resultados apresentados neste estudo, foi possível evidenciar adequadas modificações teciduais, o que sugere que a FBM isolada ou associada à Vitamina A, proporcionaram efeitos positivos em cada fase do processo de reparo tecidual. Assim, foi possível destacar os efeitos terapêuticos desencadeados pelo laser quando em interação com o tecido biológico, na modulação da inflamação, proliferação, diferenciação e síntese de proteínas específicas como o colágeno.

Dentre os dois tratamentos tópicos utilizados neste estudo, observamos que a Vitamina A atuou como indutor da neovascularização, fato esse considerado relevante tanto para o restabelecimento microvascular local, quanto para a maior migração celular, o que favoreceu de maneira direta a boa evolução das fases do processo de cicatrização.

Além disso, apesar dos achados serem positivos, e do estudo ter sido apresentado de forma longitudinal, ou seja, evidenciando cada fase do processo de reparo, cabe ressaltar que a metodologia da lesão apresentou uma limitação que deve ser destacada. A escolha da metodologia ocorreu conforme estudos prévios, que induziam no mesmo animal três feridas consecutivamente, na intenção de coletá-las em períodos distintos do processo de cicatrização, obtendo-se assim, um melhor entendimento da cascata biológica envolvida. Entretanto, cabe ainda ressaltar que a utilização deste tipo de modelo experimental minimiza a quantidade de animais envolvidos, estando assim de acordo com a avaliação e as recomendações dos comitês de ética de uso animal, inseridos dentro desta Universidade.

Porém no presente estudo verificamos uma possível interferência na sistemática de análise que compreende cada fase do processo, em especial a inflamação, já que a cada coleta de tecido possivelmente induz uma nova resposta inflamatória sistêmica, o que prejudicaria as análises funcionais da real evolução deste processo.

Sendo assim, apesar do apontamento desta limitação não afetar diretamente os resultados apresentados, sugere-se que novos modelos experimentais sejam estabelecidos, com o intuito de avaliar os mesmos protocolos de tratamento em um estudo longitudinal, porém em uma única lesão por animal, para assim obter respostas contundentes sobre a cascata do processo inflamatório bem como sua posterior evolução.

## 10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDELMALEK M.; SPENCER J. Retinoids and Wound Healing. *Dermatol Surg* 32:1219–1230, 2006.
2. AVCI P.; GUPTA A.; SADASIVAM M.; VECCHIO D.; PAM Z.; PAM N.; HAMBLIN M.R. Low Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32:41-52, 2013.
3. BAYAT A.; ARSCOTT G.; OLLIER W.E.; MCGROUTHER D.A.; FERGUSON M.W. Keloid disease: clinical relevance of single versus multiple site scars. *Br J Plast Surg*, 58(1):28-37, 2005.
4. BOSSINI P.S.; FANGEL R.; HABENSCHUS R.M.; RENNO A.C.; BENZE B.; ANTONIO J.; et al. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers in Medical Science*: 24(2):209-13, 2009.
5. BRASSOLATTI P.; BOSSINI P.S.; OLIVEIRA M.C.D.; KIDO H.W.; TIM C.R.; ALMEIDA-LOPES L.; DE AVÓ L.R.S.; MOREIRA F.M.A.; 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* 79:313-320, 2016.
6. CAETANO G.F.; FRADE M.A.C.; ANDRADE T.A.M.; LEITE M.N.; BUENO C.Z.; MORAES A.M.; RIBEIRO-PAES J.T. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Jul;103(5):1013-22, 2014.
7. CAMACHO-ALONSO F.; LÓPEZ-JOUNET P. Clinical-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 136:119-124, 2007.
8. CERINO A.; BESTAGNO M.; COLONNA M.; FUSSI F. and RICOTTI G.C.B. Carboxyethyl - aminobutyric acid, a polyamine derivative, Improves the Recovery of ebv-transformed lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications* v.150, No. 3, 1988.
9. CERINO A.; De AMICI M.; FUSSI F.F.; ASTALDI RICOTTI G.C. Carboxyethyl gamma-aminobutyric acid, a polyamine derivative molecule with a growth effect on hybridomas. *J Immunol Methods*, 18; 77(2):229-35, 1985.

10. CHILDS D.R.; MURTHY A.S. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am* 97(1):189-207, 2017
11. CHOW O. & BARBUL A. Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Advances in wound care*, 3(1): 46-53, 2014.
12. ENNIS W.J. et al. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. *Clinics in Dermatology*, 25: 63 – 72, 2007.
13. FARAGE M.A.; MILLER K.W.; ELSNER P.; MAIBACH H.I. Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care* 2(1):5-10, 2013.
14. FORTUNA T.; GONZALES A.C.; SÁ M.F.; ANDRADE Z.A.; REIS S.R.A.; MEDRADO A.R.A.P. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair, 2017.
15. FUSSI F.; SAVOLDI F.; CURTI M. Identification of N-carboxyethyl gamma-aminobutyric acid in bovine brain and human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett*,77(3): 308-10, 1987.
16. GAL P.; VIDINSKY B.; TOPORCER T.; MOKRY M.; MOZES S.; LONGAUER F.; SABO J. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 24(4):480-488, 2006.
17. GUIRRO E.C.O.; MONTEBELO M.I.L., et al. Effect of Laser (670 nm) on Healing of Wounds Covered with Occlusive Dressing: A Histologic and Biomechanical Analysis. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(5):629–634, 2010.
18. HUNT T.K. Vitamin A and wound healing. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15: 817-821, 1986.
19. KAPOOR M., et al. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during normal wound healing: A time course study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 76(2): 103-112, 2007.
20. KARU T.I.; PYATIBRAT L.V.; KALENDI G.S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* 3:211-216, 2004.
21. KARU T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*; 28(2): 159-160; 2010.
22. KARU T.I.; KOLYAKOV S.F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*; 23: 355-361; 2005.
23. KUBOTA J. Defocused diode laser therapy (830 nm) in the treatment of unresponsive skin ulcers: a preliminary trial. *J Cosmet Laser Ther* 6:96–102, 2004.



24. MELO V.A., ANJOS D.C., ALBUQUERQUE JÚNIOR R., MELO D.B., CARVALHO FU. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 26(2):129-34, 2011.
25. MOREIRA C.F., CASSINI-VIEIRA P., SILVA M.F., BARCELOS L.S. Skin Wound Healing Model-Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area, 5(22):1-4, 2015.
26. MUZZARELLI R.A.A. Chitins and Chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76: 167-182, 2009.
27. PARIZOTTO N.A. Ação do laser de helio-neonico sobre o processo de reparo tecidual : um estudo do colageno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. Tese de Doutorado-PPG-EE - Unicamp, Campinas-SP, 1998
28. RONCADA M.J. Vitaminas Lipossolúveis. Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências Nutricionais*. Sarvier, 167 – 189, 1998.
29. SILVA J.P., SILVA M.A., ALMEIDA A.P.F., JUNIOR I.L., MATOS A.P. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(1):17-21, 2010.
30. SOLMAZ H., DERVISOGLU S., GULSOY M., ULGEN Y. Laser biostimulation of wound healing: bioimpedance measurements support histology. *Laser Med Sci* 31(8):1547-1554, 2016.
31. WICKE C. et al. Effects of steroids and retinoids on wound healing. *Arch Surg*. 135: 1265-1270, 2000.
32. WILGUS T.A., et al. The Impact of Cyclooxygenase-2 Mediated Inflammation on Scarless Fetal Wound Healing. *American Journal of Pathology*, Vol. 165, n. 3, 2004.
33. YUEN D. E.; STRATFORD, A.F. Vitamin A activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 enhances porcine ileum wound healing *in vitro*. *Pediatric Research*, 55 (6), 935-939; 2004.
34. ZHANG S. et al. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *JADA*, vol. 134, p. 861-867, 2003.

# ANEXOS

**ANEXO A**

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar, nº 2-007/2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 2-007/2014**

Protocolo nº. 007/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *Ação do laser de baixa intensidade associado à cegaba e vitamina A na reparação do tecido epitelial*, submetido pelo pesquisador **ALBAIZA NICOLETTI OTERÇO**.


São Carlos, 09 de junho de 2014


**Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**




Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

## ANEXO B

Carta de **Aceite** do periódico “*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*” do artigo intitulado: “Mecanismos da Fotobiomodulação (FBM) na cinética do processo de cicatrização de feridas em ratos”.

Your manuscript JPHOTOBIOL\_2018\_131\_R1 has been accepted  [Entrada](#) x

**D Ramaiah (Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology)** <EvisSupport@elsevier.com>  
para mim 

 inglês  > português  Traduzir mensagem

Ref. JPHOTOBIOL\_2018\_131\_R1  
Title: Photobiomodulation Mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats  
Journal: Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

Dear Professor OTTERCO,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Professor D Ramaiah  
Editor  
Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

**Comments from the editors and reviewers:**  
- **Reviewer 1**  
- Manuscript well revised and accepted

- **Reviewer 2**  
-

## ANEXO C

Carta de Aceite no periódico “*Lasers in Medical Science*” intitulado “Ação da fotobiomodulação associado ou não ao retinol no processo inflamatório de feridas em ratos”

Entrada x

in the inflammatory phase of wounds healing

omodulation (670nm) associated with vitamin A on the inflammatory p

e 'Lasers in Medical Science', we look forward to your continued contrib