



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO

JOSÉ DE ALENCAR FERNANDES NETO

**AÇÃO DA FOTOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM PELE:
ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

CAMPINA GRANDE/PB

2017

JOSÉ DE ALENCAR FERNANDES NETO

AÇÃO DA FOTOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM PELE:
ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

CAMPINA GRANDE/PB

2017

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da Dissertação.

F363a Fernandes Neto, José de Alencar.

Ação da fototerapia na cicatrização de queimaduras em pele [manuscrito] : análise clínica e histológica / José de Alencar Fernandes Neto. - 2017

119 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Fototerapia. 2. Queimaduras. 3. Cicatrização. 4. Terapia com luz de baixa intensidade.

21. ed. CDD 615.831

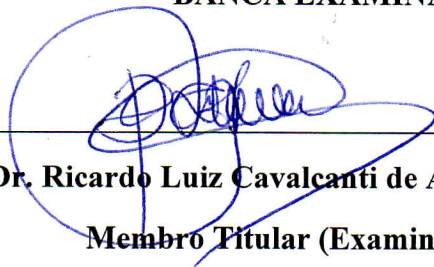
JOSÉ DE ALENCAR FERNANDES NETO

**AÇÃO DA FOTOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM PELE:
ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 19/06/2017

BANCA EXAMINADORA



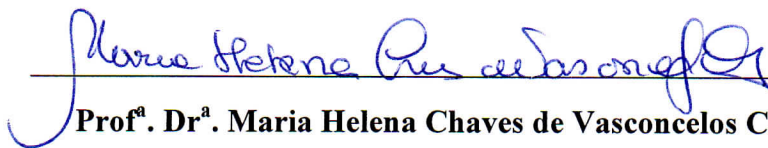
Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior/ UNIT

Membro Titular (Examinador Externo)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB

Membro Titular (Examinador Interno)



Prof.ª Dr.ª. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão/ UEPB

Membro Titular (Orientadora)

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
meus exemplos.*

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha querida orientadora, **Prof^a. Dr^a. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, por ter sempre acreditado em mim. Agradeço pelos inúmeros conselhos, paciência, amizade, cuidado e confiança. Tenha certeza que guardarei com carinho e levarei para minha vida, todos os momentos e experiências vividas, as oportunidades a mim confiadas e todas as palavras de incentivo durante esses quase dois anos. Minha sincera admiração! Desejo que trabalhemos muito juntos ainda! Obrigado por tudo e que o Senhor a abençoe e ilumine sempre!

Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, por todo apoio ao longo desse mestrado. Saiba que suas contribuições foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico e que nutro muita admiração e respeito pelo profissional e ser humano que o senhor é. Espero que possamos trabalhar juntos no futuro. Que Deus o abençoe grandemente!

À **UniFacisa**, pela parceria firmada, e por ter autorizado o desenvolvimento de parte fundamental desta pesquisa em suas instalações. Agradeço em especial à **Prof^a. Thárcia Kiara B. de Oliveira**, coordenadora do biotério, por toda atenção, ajuda e disponibilidade. Minha admiração e respeito por esta instituição séria e acolhedora.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu tudo. A Ele que é o Alfa e o Ômega, o Princípio e o Fim.

A Nossa Senhora, minha Mãe, que sempre intercede por mim.

Aos meus pais, José de Alencar Fernandes Filho e Diana de Jesus Falcão Alencar, por sempre acreditarem e apoiarem as minhas decisões e escolhas. Se hoje concluo esse mestrado, devo principalmente a eles que sempre fizeram de tudo para oferecer o melhor a mim e as minhas irmãs. Todo o meu amor, carinho e gratidão.

As minhas irmãs, Fernanda de Alencar Falcão Nunes e Renata de Alencar Falcão por todo apoio e cuidado, não só ao longo desses dois anos, mas em toda minha vida.

Ao meu sobrinho Daniel, que me alegrou nos momentos em que eu mais precisava.

Aos meus cunhados, Vitor Vinicius e Edilberto Nunes, por toda ajuda e apoio durante esses anos.

A todos os meus familiares e verdadeiros amigos que me apoiaram nesta caminhada, o meu muito obrigado! Saibam que com vocês, tudo se torna mais fácil e tranquilo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior (UNIT) por toda atenção, sugestões valiosas e disponibilidade em participar das bancas de qualificação e avaliadora dessa dissertação.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), por ter propiciado minha formação acadêmica durante a graduação e pós-graduação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB (PPGO/UEPB), por toda atenção e disponibilidade, em especial a Prof^a. Dr^a. Patrícia Meira Bento, coordenadora do Programa.

Aos companheiros de pesquisa, Camila Lima, Flávio Almeida, Hemilliany Alencar, Alieny Cristina, Renata Guimarães, Ana Luzia Batista, Maria das Graças Barbosa e Thamyres Simões por toda ajuda e apoio. Desejo sucesso em suas escolhas pessoal e profissional. Deus os ilumine!

Aos alunos da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Gildo William, Paulo Roberto, Cristinna Barbosa e Ayanne Alves, que foram de fundamental importância para a execução desta pesquisa. Agradeço de coração e desejo a todos muito sucesso em suas profissões e escolhas.

Aos queridos colegas de turma Ana Priscilla, Diego Romário, Erick Tassio, Ernani Canuto, Isabella Jardelino, Liege Helena, Luan Everton, Luana Balduino, Rodolfo Abreu e

Tomás Lucio, que tornaram esta caminhada ainda mais especial. Com certeza, uma turma inesquecível!

A minha grande amiga Niebla Bezerra de Melo, com quem dividi muitos momentos ao longo dessa caminhada. Agradeço por sempre ter me ouvido e aconselhado. Que nossa amizade, que iniciou ainda na graduação, fortificou-se durante o mestrado, cresça cada dia mais.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, por todos os ensinamentos passados ao longo desses dois anos.

A todos do laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, pelos momentos de aprendizado, ajuda e companheirismo, em especial, às queridas técnicas Denize Núbia e Ana Luzia Batista; às doutorandas Gêisa Sampaio, Marayza Alves e Fabianna Medeiros; aos mestrandos Luana Balduino, Luan Éverton, Rodolfo Abreu e Robeci Macêdo e à Prof^a. Dr^a. Pollianna Muniz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, através da concessão da bolsa de estudo/mestrado.

Às técnicas da FCM, Tatiana Carvalho e Gláucia Soares, que gentilmente me acompanharam nas atividades no biotério. Obrigado por toda disponibilidade, ajuda e contribuições. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Sr. Paulino, técnico da UFCG, por toda ajuda, conselhos e disponibilidade. Sua experiência e sabedoria foram essenciais para este estudo. Que Deus o abençoe grandemente.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Oliveira da Silva Simões, minha querida orientadora de PIBIC por quatro anos, por ter sido a primeira a acreditar em mim, ainda na graduação, aumentando ainda mais meu interesse pela pesquisa e docência.

A todos os funcionários da UEPB, que de forma direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e com minha formação, o meu muito obrigado.

A todos, que de alguma maneira, colaboraram na minha caminhada acadêmica e para o desenvolvimento dessa dissertação, minha eterna gratidão.

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

Filipenses 4, 13

RESUMO

RESUMO

As queimaduras são consideradas um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre essas lesões, as queimaduras de terceiro grau são consideradas as mais graves, pois destroem todas as camadas da pele, podendo também atingir músculos, ligamentos, tendões e ossos. Atualmente, dentre as novas terapias estudadas que visam a aceleração e otimização do processo de cicatrização dessas injúrias, tem-se a fototerapia com o uso de Diodo Emissor de Luz (LED) em diferentes comprimentos de onda. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação do LED vermelho e azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos. Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, machos, divididos aleatoriamente em 3 grupos: controle (CTR) (n=20), LED vermelho (VERM) (n=20) e LED azul (AZUL), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). As aplicações do LED vermelho (630 ±10nm, 300 mW, 9 J/cm² por ponto, 30 segundos) e azul (470nm, 1W, 12,5 J/cm² por ponto, 28 segundos) foram realizadas diariamente em contato com quatro pontos da ferida (total: 36 J/cm² no VERM e 50 J/cm² no AZUL), exceto no dia da eutanásia. O consumo de comida dos animais foi mensurado a cada dois dias nos 3 grupos, com auxílio de uma balança analítica. Após eutanásia dos animais nos tempos preestabelecidos, realizou-se a avaliação do Índice de Retração da Ferida (IRF), remoção do espécime e os cortes foram submetidos a coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM). Em 7 dias, observou-se que o IRF do CTR foi maior que do VERM ($p=0,01$) e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AZUL e CTR ($p>0,05$) em todos os períodos avaliados. O Índice Angiogênico (IA) do CTR foi menor quando comparado ao VERM ($p=0,02$) e AZUL ($p=0,01$) em 7 dias, e maior quando comparado ao VERM em 21 dias (0,04). Os animais do CTR consumiram menos ração que o VERM em 7, 14 e 28 dias ($p<0,05$) e que o AZUL em 14, 21 e 28 dias ($p<0,05$). Em 28 dias, todos os grupos apresentaram predominância de infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve, todos os casos do VERM apresentaram reepitelização completa e do AZUL, no mesmo período, reepitelização incompleta. Este estudo sugere que o LED, nas dosimetrias utilizadas, contribui em etapas importantes da cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele, estimulando, em estágios iniciais, a reepitelização, angiogênese, atenuação da resposta inflamatória e possíveis efeitos analgésicos. Com base nos achados dessa pesquisa, estudos futuros serão importantes para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da fotobiomodulação desses dois tipos de LED na cicatrização dessas injúrias.

Palavras-chave: Fototerapia; Queimaduras; Cicatrização; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

ABSTRACT

Burns are considered a serious public health problem worldwide. Among these lesions, third degree burns are considered the most serious ones, since they cause the destruction of all layers of the skin, which can also reach muscles, ligaments, tendons, and bones. Currently, among the new studied therapies that aim to accelerate and optimize the healing process of these injuries, there is the phototherapy with the use of Light Emitting Diode (LED) at different wavelengths. The objective of this study was to evaluate the effects of red and blue LED photobiomodulation on the healing of third degree burns in rat skin, through clinical and histological parameters. 60 *Wistar* male rats were randomly divided into three groups: control (CTR) (n = 20), red LED (RED) (n = 20) and blue LED (BLUE), with subgroups (n = 5) for each time of euthanasia (7, 14, 21 and 28 days). The red (630 ± 10nm, 300 mW, 9 J/cm² per point, 30 seconds) and blue LED applications (470 nm, 1W, 12.5 J/cm² per point, 28 seconds) were performed daily in contact with four points of the wounds (total: 36 J/cm² in the RED and 50 J/cm² in the BLUE), except on the day of euthanasia. The food consumption of the animals was measured every two days in the 3 groups, with the aid of an analytical balance. After euthanasia of the animals at the pre-established times, the Wound Retention Index (WRI) and removal of the specimen were performed and the sections were stained in Hematoxylin-Eosin (HE) and Masson's Trichrome (MT). At 7 days, it was observed that the WRI of the CTR was greater than the RED (p = 0.01) and there were no statistically significant differences between the BLUE and CTR groups (p > 0.05) in all evaluated periods. The Angiogenic Index (AI) of CTR was lower when compared to RED (p = 0.02) and BLUE (p = 0.01) in 7 days, and higher when compared to RED in 21 days (0.04). The CTR animals consumed less food than the RED ones at 7, 14 and 28 days (p < 0.05) and the BLUE at 14, 21 and 28 days (p < 0.05). At 28 days, all groups presented a predominance of chronic inflammatory infiltrate of mild intensity, all cases of the RED group presented complete re-epithelialization and BLUE, in the same period, incomplete re-epithelialization. This study suggests that LED, in the dosimetry used, contributes to important steps in the healing of third degree burns, stimulating re-epithelialization, angiogenesis, attenuation of the inflammatory response and possible analgesic effects in the initial stages. Based on the findings of this research, future studies will be important to deepen the knowledge about the effects of photobiomodulation of these two types of LED in the healing of these injuries

Keywords: Phototherapy; Burns; Wound Healing; Low Intensity Light Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	(A) Cloridrato de cetamina 10% utilizado. (B) Xilazina 2% escolhida para anestesia. (C) Aplicação da solução anestésica em região intraperitoneal. (D) Realização da tricotomia no dorso do animal. (E) Aspecto final após realização da tricotomia.....	34
Figura 2.	(A) Solução utilizada para antisepsia tópica previamente à queimadura. (B) Aquecimento do instrumento metálico na chama azul do maçarico por 40 segundos. (C) Instrumento metálico aquecido em contato com a pele do animal por 20 segundos.....	35
Quadro 1.	Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia.....	35
Figura 3.	(A) Aplicação do LED vermelho. (B) Aplicação do LED azul.....	36
Quadro 2.	Características dos tratamentos realizados na pesquisa.....	36
Figura 4.	Substância utilizada para eutanásia dos animais.....	37
Figura 5.	(A) Tripé com câmera fotográfica digital acoplada para fotografia das feridas. (B) Mensuração da área exata da ferida através do programa <i>Image J</i> versão 1.50i.....	38
Figura 6.	(A) Organização da mesa cirúrgica e posicionamento do animal. (B) Recipientes identificados contendo formol 10%. (C) Remoção da ferida. (D) Espécime envolvido em gaze estéril e submerso em formol 10%.....	39
Quadro 3.	Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (MEIRELES et al., 2008).....	41
Quadro 4.	Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (SOUZA et al., 2013).....	42
Figura 1.	Regressão das queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias) (artigo 1).....	62
Figura 2.	Reepitelização e intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7,14,21 e 28 dias) (artigo 1).....	63
Figura 3.	Avaliação histológica das feridas em diferentes períodos (artigo 1).....	64

Figura 4.	Gráfico box-plot do índice angiogênico nas queimaduras de terceiro grau em pele de acordo com o grupo e tempos de eutanásia (artigo 1)....	66
Figura 1.	Regressão clínica das feridas até 28 dias após a queimadura (artigo 2)...	82
Figura 2.	Reepitelização e intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7,14,21 e 28 dias) (artigo 2).....	83
Figura 3.	Avaliação histológica das feridas em diferentes períodos (artigo 2).....	84
Figura 4.	Gráfico box-plot do índice angiogênico nas queimaduras de terceiro grau em pele de acordo com o grupo (artigo 2).....	87

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (MEIRELES et al., 2008) (artigo 1).....	59
Tabela 2.	Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (SOUZA et al., 2013) (artigo 1).....	60
Tabela 3.	Comparação do consumo de ração por animal entre os grupos experimentais (artigo 1).....	61
Tabela 1.	Valores do Índice de Retração da Ferida (IRF) de ambos os grupos, em diferentes tempos de avaliação (artigo 2).....	79
Tabela 2.	Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (Meireles et al., 2008) (artigo 2).....	80
Tabela 3.	Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (Souza et al., 2013) (artigo 2).....	81
Tabela 4.	Comparação do consumo de ração por animal entre os grupos experimentais (artigo 2).....	86

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AM	Amazonas (estado brasileiro).
AZUL	Grupo que recebeu fototerapia com LED azul.
°C	Grau Celsius (unidade de temperatura).
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento.
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais.
CIAEP	Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa.
Cm	Centímetro (unidade de comprimento).
cm²	Centímetro quadrado.
cm³	Centímetro cúbico.
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
COX-2	Ciclo-oxigenase 2.
CTR	Grupo controle.
DE	Do Alemão <i>Deutschland</i> , traduzido com Alemanha.
FCM	Faculdade de Ciências Médicas.
°GL	Grau GL (sigla de Gay Lussac), fração em volume.
HE	Hematoxilina-Eosina.
IA	Índice Angiogênico.
IRF	Índice de Retração da Ferida.
J	Joule (unidade de energia).
Kg	Quilograma (unidade básica de massa).
Laser	Do inglês, <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , traduzido como Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.
LED	Do inglês, <i>Light Emitting Diode</i> , traduzido como Diodo Emissor de Luz.
LTDA	Limitada (termo jurídico).
µm	Micrômetro (unidade de comprimento).
Mg	Miligrama (unidade de massa).
MG	Minas Gerais (estado brasileiro).
mL	Mililitro (unidade de volume).
mW	Miliwatt (unidade de potência).

n°	Número.
NJ	New Jersey, estado americano.
nm	Nanômetro (unidade de comprimento).
PB	Paraíba, estado brasileiro.
PVC	Policloreto de polivinila.
SP	São Paulo, estado brasileiro.
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba.
USA	Do inglês, <i>United States of America</i> , traduzido como Estados Unidos da América.
VEGF	Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
VERM	Grupo que recebeu fototerapia com LED vermelho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	25
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	33
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	33
3.3 AMOSTRA	33
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
3.5 ANESTESIA E TRICOTOMIA	34
3.6 INDUÇÃO DA QUEIMADURA	34
3.7 CARACTERÍSTICAS DO LED	35
3.8 CARACTERÍSTICAS DOS TRATAMENTOS	36
3.9 CONSUMO DE COMIDA	37
3.10 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	37
3.11 CÁLCULO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO DA FERIDA (IRF)	37
3.12 PROCESSAMENTO E ESTUDO MORFOLÓGICO	38
3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA	41
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
ARTIGOS	44
4.1 APRESENTAÇÃO	44
4.2 ARTIGO 1	45
4.3 ARTIGO 2	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	98
ANEXOS	100

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As queimaduras podem ser definidas como lesões traumáticas na pele ou em outros tecidos do corpo, causadas principalmente pelo calor, radiação, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos. São consideradas um grave problema de saúde pública, causando aproximadamente 265.000 mortes por ano no mundo, ocorrendo em sua maioria nos países de baixa e média renda, principalmente na casa e local de trabalho da vítima. As queimaduras não-fatais são uma das principais causas de morbidade, incluindo hospitalização prolongada, desfiguração e incapacidade, deixando muitas vezes grande impacto físico e psicológico nas vítimas (WHO, 2016).

Dependendo de sua profundidade e extensão na pele podem ser classificadas em queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau (LEE; JOORY, MOIEMEN, 2014). As lesões de primeiro grau são mais superficiais e comprometem apenas a epiderme. Não formam bolhas, causam dor variável e eritema e regridem em poucos dias sem deixar cicatrizes. As queimaduras de segundo grau atingem completamente a epiderme e parcialmente a derme, causam dor, eritema, bolhas, edema e ulceração. A cicatrização é mais lenta, entre 2 e 4 semanas, podendo deixar cicatrizes e manchas claras ou escuras (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017).

As queimaduras de terceiro grau destroem todas as camadas da pele, podendo também atingir músculos, ligamentos, tendões e ossos. São lesões brancas ou escurecidas, secas e inelásticas, eventualmente podem cicatrizar com retração das bordas, deixando deformidades ou cicatrizes. A sensação dolorosa geralmente é pequena ou inexistente pois a lesão é tão profunda que danifica as terminações nervosas do local (MORAES et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014; CATÃO et al., 2015).

A cicatrização de queimaduras é um processo complexo e dinâmico, altamente regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares. Começa imediatamente após o ferimento e prossegue em três fases inter-relacionadas e dinâmicas que se sobrepõem no tempo (REINKE; SORG, 2012; DARBY et al., 2014; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017).

A fase inflamatória ou exsudativa inicia-se imediatamente após a lesão e nela se observa a formação de uma rede de fibrina e a migração de células inflamatória. Os neutrófilos, primeiras células a chegar ao local, têm funções antimicrobianas inatas, além de liberar proteases para eliminar tecido necrótico e mediadores que amplificam a resposta inflamatória. Os monócitos se transformam em macrófagos no local, eliminam detritos e micro-organismos

e também liberam fatores de crescimento importantes que iniciam a formação do tecido de granulação (REINKE; SORG, 2012; PAKYARI et al., 2013).

A segunda fase, denominada proliferativa (5 a 20 dias geralmente), é responsável pela cobertura da superfície da ferida, formação do tecido de granulação e restauração da rede vascular. É nessa etapa onde observa-se o início da reepitelização, pela migração de ceratinócitos, a proliferação de fibroblastos, angiogênese, produção de colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina, elastina e outras proteínas da matriz extracelular e início do fenômeno de contração realizado pelos miofibroblastos (REINKE; SORG, 2012).

O fenômeno chave da contração da ferida é a diferenciação fenotípica dos fibroblastos preexistentes, em miofibroblastos, caracterizados pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) que concede a essas células a propriedade de contrair-se, e conseqüentemente, contrair o tecido. Geralmente ocorre a partir da segunda semana de cicatrização, onde os fibroblastos se tornam as populações mais numerosas de células no tecido de granulação (DARBY et al., 2014; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A restauração da microcirculação no local da queimadura com a formação de vasos sanguíneos é essencial para a cicatrização e reparo da área lesada, pois além de ser um meio de condução celular, fornece oxigênio e nutrientes aos tecidos, permitindo assim a proliferação de células e deposição de proteínas importantes, como o colágeno (BUSUIOC et al., 2011; COLOMBO et al., 2013).

A última fase da cicatrização é a de maturação ou remodelação, dura meses, onde a ferida é contraída e observa-se a maturação das fibras colágenas e redução da quantidade de capilares, por agregação em vasos sanguíneos maiores. A densidade celular e a atividade metabólica do tecido também são reduzidas. Portanto, nessa fase, o tecido cicatricial inicial, caracterizado por fibras colágenas delicadas e desorganizadas, é substituído por uma matriz que se assemelha à derme em que as fibras de colágeno maduras, de diâmetro apropriado, caracterizam o novo tecido formado (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

Nos últimos 50 anos, observou-se grandes avanços no tratamento de queimaduras, porém há ainda muitas áreas relacionadas ao cuidado dessas injúrias que merecem ser melhor exploradas e otimizadas (LEE; JOORY, MOIEMEN, 2014). A necessidade de cuidar desses tipos de feridas ainda é um desafio crescente que requer estratégias inovadoras (CHAVES et al., 2014).

Terapias que acelerem o processo de reparo, aumentem a qualidade de vida do paciente e reduzam custos de tratamento, vêm sendo foco de diversas pesquisas científicas. Dentre os

métodos terapêuticos testados estão os tratamentos tópicos com agentes fitoterápicos (AKHOONDINASAB et al., 2015; BEJENARU et al., 2016), ultrassom terapêutico de baixa intensidade (FANTINATI et al., 2016; MESQUITA et al., 2016), uso de biomateriais (DAS; BAKER, 2016; BANO et al., 2017), terapia fotodinâmica (TFD) (GARCIA et al., 2010; CATÃO et al., 2015) e a fototerapia com uso de *Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)* ou LED (*Light Emitting Diode*) (CATÃO et al., 2015; GUPTA et al., 2015; TRAJANO et al., 2015; BRASSOLATTI et al., 2016; GOMES et al., 2017; MEDEIROS et al., 2017).

Os LEDs são dispositivos compostos por semicondutores sólidos, ligados entre si, com propriedade de transformar energia elétrica em uma luz monocromática que pode promover a iluminação de uma superfície ampla e de forma homogênea. São equipamentos de fácil uso, com meia vida longa (até 50.000 horas) e flexibilidade de *design* (CHANG et al., 2012).

A fototerapia compreende a aplicação de luz no tratamento de várias condições patológicas. A fotobiomodulação, anteriormente denominada "Terapia com Luz de Baixa Intensidade", uma das categorias da fototerapia, envolve a aplicação de uma fonte de luz de baixa potência, não térmica e não ablativa, predominantemente o *Laser* ou LED, para estimular ou inibir diretamente processos celulares e biológicos. Os efeitos terapêuticos dependem tanto das características ópticas de cada tecido quanto das propriedades fotofísicas da luz, que incluem parâmetros de irradiação, como comprimento de onda, potência, irradiância, tempo de exposição e frequência de pulso (AVCI et al., 2013; FREITAS; HAMBLIN, 2016; HADIS et al., 2017; YADAV; GUPTA, 2017).

O completo mecanismo de ação da fotobiomodulação ainda não está totalmente claro, mas sabe-se que a luz em baixa intensidade pode interagir com células, levando a mudanças nos níveis molecular, celular e tecidual. Cada tecido, no entanto, responde a essa interação de maneira diferente (FREITAS; HAMBLIN, 2016), a partir que a luz é absorvida ou não por moléculas do tecido alvo que são denominadas como cromóforos ou fotorreceptores.

É reconhecido que a luz em baixas doses pode modular significativamente a produção de citocinas, fatores de crescimento, interleucinas e várias outras moléculas intracelulares. A luz visível atua também diretamente sobre a enzima citocromo-c oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial celular, responsável principalmente pela indução da síntese de adenosina trifosfato (ATP), essencial para o metabolismo energético celular (GAO; XING, 2009; KIM; CALDERHEAD, 2011; FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Os efeitos da luz sobre a proliferação celular podem ser estimuladores em baixas doses (o que é útil na cicatrização de feridas, por exemplo), mas também inibitórios em altas doses,

onde os fotorreceptores podem ser danificados e os efeitos diminuídos (o que pode ser útil em cicatrizes hipertróficas e quelóides) (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Diferentemente do *Laser*, a luz LED não apresenta as características de colimação e coerência espacial e temporal. Alguns pesquisadores acreditam que a coerência desempenha um papel fundamental e, portanto, o LED seria menos eficiente do que o *Laser* ou mesmo incapaz de promover efeitos terapêuticos (CHAVES et al., 2014).

Apesar do LED não ser uma luz coerente, estudos apontam que os efeitos fotoquímicos nos tecidos acontecem independente da coerência da luz, já que essa propriedade é perdida logo no primeiro extrato da pele, antes da luz ser absorvida pelos cromóforos, não sendo determinante, portanto, no resultado do tratamento (AGNOL et al., 2009; SOUSA et al., 2013). A introdução do LED na fototerapia reduziu algumas preocupações anteriormente associadas aos *lasers*, simplificando, por exemplo, a fotobiomodulação em grandes áreas da pele (KIM; CALDERHEAD, 2011) e reduzindo os custos de aquisição e tratamento, já que os LEDs são gerados em dispositivos mais baratos (AVCI et al., 2013).

Benefícios terapêuticos da fotobiomodulação no tratamento de feridas cutâneas têm sido relatados em pesquisas, porém muitos dos resultados descritos na literatura mostram inconsistência, principalmente devido a vieses de metodologia ou falta de padronização nos estudos. É importante considerar que os efeitos biológicos são dependentes dos parâmetros de aplicação, especialmente do comprimento de onda da luz e dose aplicada, destacando-se, assim, a importância da determinação de um protocolo apropriado antes de qualquer tratamento. Além disso, o uso do LED como recurso terapêutico continua controverso (CHAVES et al., 2014).

Os efeitos biológicos promovidos por esses recursos no processo de reparo estão relacionados com a atenuação da resposta inflamatória (GUPTA et al., 2015; CATÃO et al., 2016), aumento da proliferação de fibroblastos (SOUSA et al., 2010), estimulação da angiogênese (SOUSA et al., 2013; MEDEIROS et al., 2017), aumento da síntese de colágeno (FIÓRIO et al., 2014; CATÃO et al., 2015), estímulo à reepitelização (ADAMSKAYA et al., 2011) e efeitos analgésicos (LINS et al., 2010; FABRE et al., 2015).

Como a maioria dos estudos sobre fototerapia na cicatrização de feridas cutâneas e queimaduras em pele utilizaram o *Laser* como fonte de luz (COLOMBO et al., 2013; CHIAROTTO et al., 2014; BRASSOLATTI et al., 2016), pesquisas recentes têm avaliado os efeitos do LED nesse processo (FUSHIMI et al., 2012; CATÃO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016; FEKRAZAD et al., 2017) com diferentes parâmetros e tempos de avaliação.

O LED azul (400-470 nm) tem penetração máxima no tecido de aproximadamente 1 mm, tendo assim como alvo mais profundo a epiderme, sendo adequado, portanto, para o

tratamento de condições patológicas mais superficiais. O LED vermelho (630-700 nm) tem a penetração mais profunda (2-3 mm) dos LEDs com comprimentos de onda visíveis e desse modo, é utilizado para modular estruturas dérmicas, como anexos e fibroblastos (OPEL et al., 2015).

Adamskaya et al. (2011) avaliaram os efeitos do LED azul (470 nm) *in vivo* na cicatrização de feridas através de uma excisão em pele de ratos e observaram que após 7 dias, a luz azul diminuiu significativamente o tamanho da ferida e estimulou fortemente a reepitelização, quando comparado a um grupo controle.

Estudos experimentais que avaliaram *in vivo* a eficácia da fotobiomodulação com LED vermelho no reparo de queimaduras de terceiro grau observaram nos grupos que receberam fototerapia, uma atenuação significativa no número de células inflamatórias (FIÓRIO et al., 2011), significativa redução da área da ferida, aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno (NEVES et al., 2014).

Apenas duas pesquisas encontradas na literatura avaliaram os efeitos *in vivo* do LED azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele (FEKRAZAD et al., 2014; FEKRAZAD et al., 2017), onde em ambos não se observou diferenças estatisticamente significativas na retração da ferida entre os grupos tratados com LED e controle. Fekrazad et al. (2014) observaram um leve efeito anti-inflamatório do LED azul durante a fase aguda do ferimento e enalteceram a necessidade de mais estudos para investigar outros protocolos e prescrições de irradiação com LED terapêutico, esclarecendo melhor seu papel no tratamento de queimaduras.

A fototerapia com LED é um campo de pesquisa e atuação animador, que ainda não atingiu todo seu potencial, onde os protocolos e dados publicados devem ser melhor explorados. Assim, mais estudos devem ser executados, inclusive com diferentes comprimentos de onda, para que sejam encaminhadas orientações definitivas da prática. À medida que o uso do LED se expandir e suas indicações se tornarem melhor definidas, tratamentos mais eficazes estarão disponíveis (OPEL et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação do LED vermelho e azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação do LED vermelho e azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o grau de retração da ferida entre os grupos em diferentes tempos de reparo;
- Comparar o consumo de comida entre os grupos experimentais;
- Determinar os índices percentuais de reepitelização nos grupos;
- Analisar histologicamente a intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas entre os grupos e em diferentes tempos de reparo;
- Mensurar e comparar o índice angiogênico entre os grupos experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Tratou-se de uma pesquisa experimental pré-clínica explicativa com abordagem analítica quantitativa.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB (CIAEP/CONCEA nº: 01.001.2012) e seguiu os preceitos da lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (ANEXO A).

3.3 AMOSTRA

Foram utilizados 60 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) em Campina Grande/PB.

Os animais foram alojados em caixas plásticas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com 5 ratos por caixa, forradas com cama de maravalha e com tampa de grade metálica por onde recebiam água *ad libitum* por sucção em frasco de vidro e ração padronizada (*Presence*[®] Ratos e Camundongos, Linha Laboratório, Paulínia, SP, Brasil). A temperatura do biotério foi padronizada em 22°C ± 2°C sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro). Foram excluídos os animais que apresentaram qualquer manifestação de doença local ou sistêmica.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 60 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (CTR) (n=20), grupo LED vermelho (VERM) (n=20) e grupo LED azul (AZUL) (n=20), com subgrupos de 5 ratos para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias após a queimadura).

3.5 ANESTESIA E TRICOTOMIA

Previamente à tricotomia e indução da queimadura, todos os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (Cetamin[®], Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (Dopaser[®], Hertape, Juatuba, MG, Brasil) aplicada na região intraperitoneal com uma seringa estéril de uso único (com agulha) de 1mL para insulina (SR[®], Manaus, AM, Brasil) (FIGURA 1).

Constatado o plano anestésico profundo, os animais foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a tricotomia em região de dorso, utilizando lâmina de barbear (LORD[®] co., Alexandria, Egito), porta-agulha e solução de digliconato de clorexidina 4% (Riohex[®] 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) (FIGURA 1).

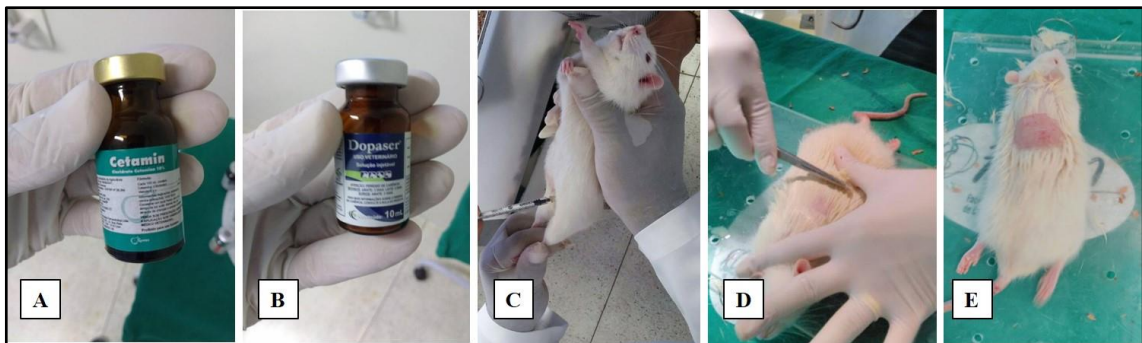


Figura 1. (A) Cloridrato de cetamina 10% utilizado. (B) Xilazina 2% escolhida para anestesia. (C) Aplicação da solução anestésica em região intraperitoneal. (D) Realização da tricotomia no dorso do animal. (E) Aspecto final após realização da tricotomia.

3.6 INDUÇÃO DA QUEIMADURA

Antes da queimadura, realizou-se na pele do animal uma antisepsia tópica com gaze estéril embebida em solução de digliconato de clorexidina 0,5% (Riohex[®] 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) (FIGURA 2).

A queimadura foi realizada por um único operador devidamente calibrado, com um instrumento metálico, previamente confeccionado, com ponta ativa chata, plana e de dimensão de 1 cm³. Esta foi aquecida pelo contato direto com a chama azul de um maçarico por 40 segundos e logo após encostada na pele do dorso do animal por 20 segundos, segundo metodologia de Meyer e Silva (1999) modificada por Catão et al. (2015).

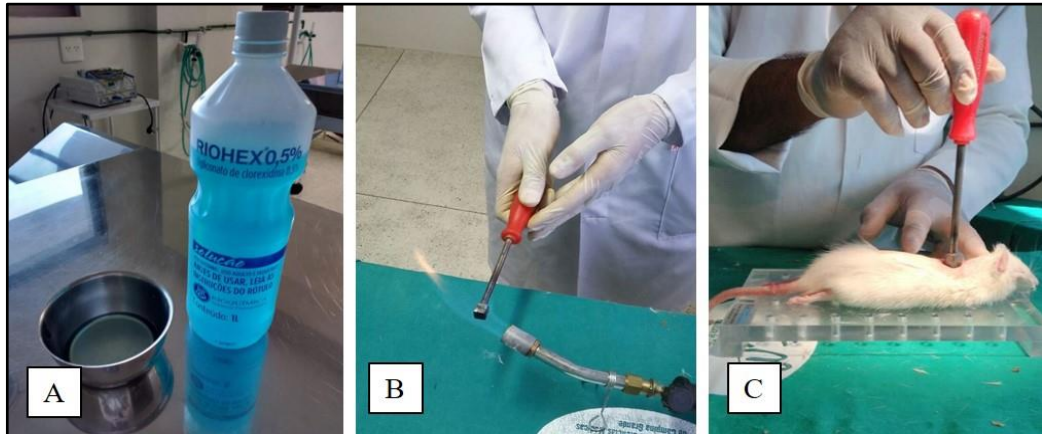


Figura 2. (A) Solução utilizada para antissepsia tópica previamente à queimadura. (B) Aquecimento do instrumento metálico na chama azul do maçarico por 40 segundos; (C) Instrumento metálico aquecido em contato com a pele do animal por 20 segundos.

3.7 CARACTERÍSTICAS DO LED

Para a realização da fototerapia com LED vermelho utilizou-se o equipamento eletromédico *Bios Therapy II*[®] (Bios Equipamentos Médicos, São José dos Campos, SP, Brasil). O aparelho de LED azul escolhido foi o *Easy Bleach*[®] (Clean Line Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos LTDA, Taubaté, São Paulo, Brasil). As informações técnicas dos dois equipamentos estão contidas no quadro 1.

Quadro 1. Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia.

Parâmetros	<i>Bios Therapy II</i> [®] (LED Vermelho)	<i>Easy Bleach</i> [®] (LED Azul)
Potência	300 mW	1 W
Comprimento de onda	630 ± 10 nm	470 nm
Medida da ponta	0,7 cm	1,6 x 1,4cm
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo

3.8 CARACTERÍSTICAS DOS TRATAMENTOS

A aplicação do LED, realizada por um único operador devidamente calibrado, iniciou-se imediatamente após a indução da queimadura, e se repetiu diariamente, exceto nos dias de eutanásia (FIGURA 3). As demais características do tratamento estão dispostas no quadro 2.

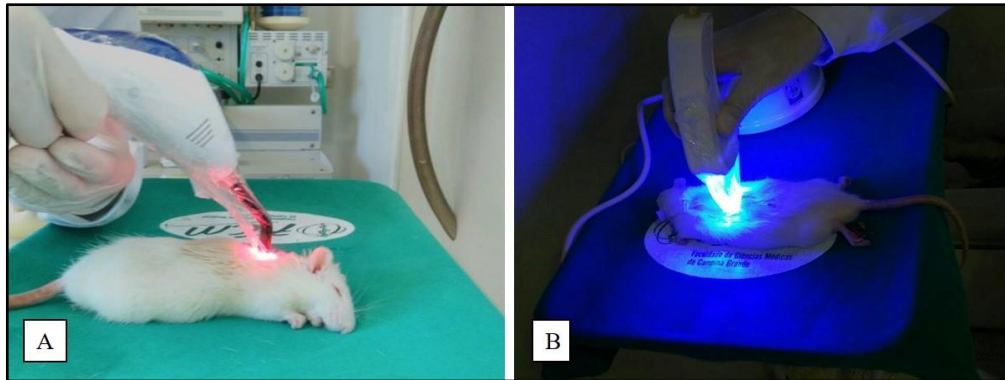


Figura 3. (A) Aplicação do LED vermelho. (B) Aplicação do LED azul.

Quadro 2. Características dos tratamentos realizados na pesquisa.

Grupo Controle	Grupo Vermelho	Grupo Azul
Foi simulado nenhum tratamento de LED.	Aplicações diárias (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual e em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida, depositando 9 J/cm ² , por 30 segundos, totalizando 36 J/cm ² por sessão.	Aplicações diárias (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual e em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida, depositando 12,5 J/cm ² , por 28 segundos, totalizando 50 J/cm ² por sessão.

Todas as normas de biossegurança foram rigorosamente seguidas, como: uso de jaleco, máscara, luvas de procedimento, óculos de proteção para luz intensa e utilização de plástico filme de PVC na ponta do equipamento como barreira de proteção, para evitar possíveis infecções cruzadas.

3.9 CONSUMO DE COMIDA

O consumo de ração foi calculado pela diferença da massa entre dois dias consecutivos, através de uma balança analítica Shimadzu® modelo BL3200H (Shimadzu do Brasil Comércio LTDA, São Paulo, SP, Brasil). A cada dois dias, durante os tempos avaliados, a caixa com os animais recebeu uma quantidade de 200g±5g de alimento. Os valores (quantidade colocada e quantidade que sobrava) foram anotados numa ficha previamente confeccionada (APÊNDICE A) para posteriormente ser calculado o valor do consumo por animal.

3.10 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o período experimental de cada subgrupo, os animais seguiram para eutanásia, sendo alojados em uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com halotano (Tanohalo® 1mL/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil) (FIGURA 4). A morte foi constatada por dois avaliadores previamente calibrados através da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos. Realizada a eutanásia, os animais foram recolhidos por uma empresa especializada e encaminhados para incineração.



Figura 4. Substância utilizada para eutanásia dos animais.

3.11 CÁLCULO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO DA FERIDA (IRF)

Para a avaliação da retração da ferida, as lesões foram fotografadas com câmera fotográfica digital *Sony SteadyShot* (DSC-W710 16.1 MP) *Zoom 5x*, a uma distância padronizada de 15 cm, com auxílio de um tripé. Uma régua foi utilizada na mesma altura do

dorso do animal, para servir de escala, sem que a mesma entrasse em contato com a ferida (figura 5).

As imagens foram analisadas no programa gratuito *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Depois de transferir a fotografia para o programa, realizou-se a mensuração da distância de 1cm na régua, para a escolha da escala em centímetros, por meio da ferramenta *Straight line selection* e a opção *Set scale* na guia *Analyze*. Logo após, a ferida foi detalhadamente contornada por um único avaliador e de forma cega, através da ferramenta *Freehand selections*. Feito isso, o programa calculou a área de interesse, por meio da ferramenta *Measure*, na guia *Analyze* (FIGURA 5).

$$\text{O IRF foi calculado pela equação: } \text{IRF}(\%) = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}}{\text{área inicial} \times 100}.$$

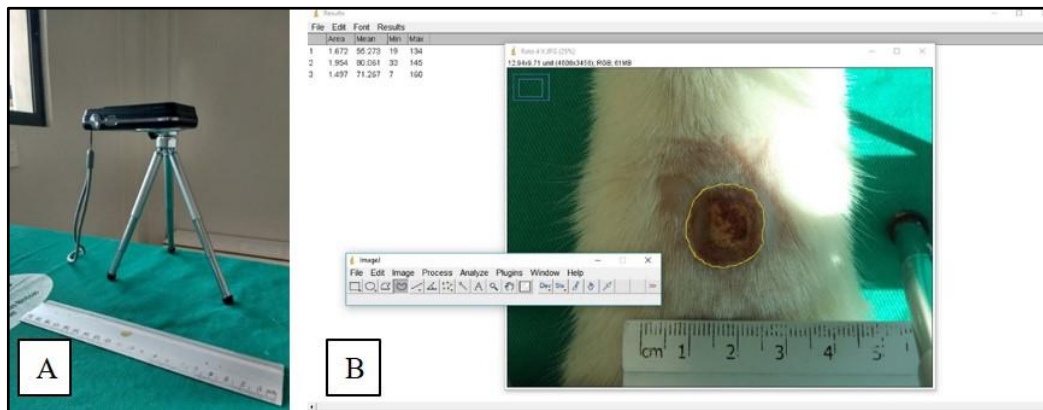


Figura 5. (A) Tripé com câmera fotográfica digital acoplada para fotografia das feridas. (B) Mensuração da área exata da ferida através do programa *Image J* versão 1.50i.

3.12 PROCESSAMENTO E ESTUDO MORFOLÓGICO

Constatada a morte do animal, realizou-se a remoção do espécime. A ferida foi excisada com bisturi e tesouras estéreis, respeitando-se uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm, e acondicionada submersa em recipiente plástico contendo formol a 10%, por 24 horas. Os recipientes foram todos etiquetados com o nome do grupo e subgrupo experimental, número do animal e data da eutanásia (FIGURA 6).

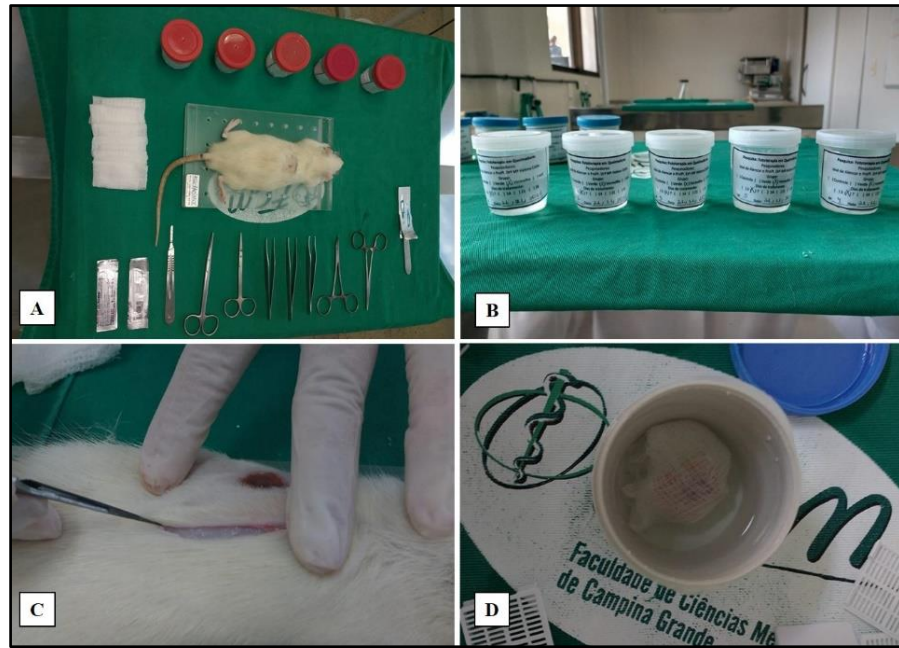


Figura 6. (A) Organização da mesa cirúrgica e posicionamento do animal. (B) Recipientes identificados contendo formol 10%. (C) Remoção da ferida. (D) Espécime envolvido em gaze estéril e submerso em formol 10%.

No Laboratório de Histopatologia Oral no Departamento de Odontologia da UEPB, a amostra fixada em formol a 10%, foi incluída em parafina e submetida a cortes de 3 μ m de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos a métodos para coloração, de acordo com os protocolos descritos a seguir:

- **Hematoxilina-Eosina (HE)**

⇒ Desparafinização: dois banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);

⇒ Hidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 70°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 70°GL (5 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos);

⇒ Imersão em Hematoxilina de Harris (2 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos);

⇒ Imersão em eosina de Lison (2 minutos);

- ⇒ Três banhos em álcool etílico absoluto (5 minutos cada);
- ⇒ Três passagens em xilol (5 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *Permout*[®] (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

- **Tricrômico de Masson (*EasyPath*[®], São Paulo, SP, Brasil)**

- ⇒ Desparafinização: dois banhos em xilol, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- ⇒ Hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 70°GL (5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos);
- ⇒ Passagem rápida em água destilada e secagem das lâminas;
- ⇒ Junção dos reagentes A (hematoxilina férrica de Weigert – solução A) + B (hematoxilina férrica de Weigert – solução B) em um *becker* pequeno na seguinte proporção por lâmina: 5 gotas do reagente A + 5 gotas do reagente B.
- ⇒ Aplicação da solução (A + B) na seção de tecido (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos) e secagem das lâminas;
- ⇒ Aplicação de 5 gotas por lâmina do reagente C (fucsina) (4 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos);
- ⇒ Aplicação de 5 gotas por lâmina do reagente D (ácido fosfomolibdico) (5 minutos);
- ⇒ Secagem das lâminas, sem lavá-las;
- ⇒ Aplicação de 5 gotas por lâmina do reagente E (azul de anilina) (5 minutos);
- ⇒ Passagem rápida em água destilada;
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 70°GL (passagem rápida);
 - Álcool etílico 95°GL (passagem rápida);
 - Álcool etílico absoluto (3 minutos);
- ⇒ Duas passagens em xilol (5 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *Permout*[®] (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) dois examinadores previamente calibrados e de forma cega realizaram a avaliação do grau de reepitelização das feridas seguindo os critérios adotados por Meireles et al. (2008) (quadro 3). Os parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas foram baseados no estudo de Souza et al. (2013) (quadro 4).

A contagem microvascular foi mensurada pela contagem do número de vasos em cinco campos ($\times 400$ ampliação) de maior vascularização por espécime (SOUSA et al., 2013). Cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador, onde contabilizou-se os vasos sanguíneos com auxílio do programa gratuito *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Em sequência, foi estabelecido o número médio de vasos para cada animal.

A formação do tecido de granulação e deposição de colágeno de cada subgrupo foram analisadas descritivamente, de forma cega, por dois avaliadores previamente treinados.

Quadro 3. Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (MEIRELES et al., 2008).

Escores	Descrição
0	Ausente
1	Presente, cobrindo <50% da ferida
2	Presente, cobrindo >50% da ferida
3	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular
4	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular

Quadro 4. Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (SOUZA et al., 2013).

Escore da resposta inflamatória	Semiquantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Leve	Crônica (predominância de linfócitos e histiócitos)
2	Moderada	
3	Intensa	
4	Intensa	Subaguda (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos)
5	Intensa	Aguda (predominância de neutrófilos)

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi utilizado o programa IBM® SPSS Statistics (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O consumo de comida, IRF e IA foram analisados através do teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 5% para diferenças observadas quando $p < 0,05$. Os dados de reepitelização e resposta inflamatória foram analisados descritivamente.

ARTIGOS

4 ARTIGOS

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, 2 artigos são apresentados nesta dissertação:

ARTIGO 1

Ação do LED vermelho ($630 \pm 10\text{nm}$) na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele: análise clínica e histológica

O referido artigo será submetido ao periódico *Lasers in Medical Science* (Qualis Odontologia A2/ Fator de impacto: 2.461).

ARTIGO 2

LED azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele: avaliação clínica e histológica

O referido artigo será submetido ao periódico *Burns* (Qualis Odontologia B1/ Fator de impacto: 1.904).

4.2 ARTIGO 1

Ação do LED vermelho (630 ±10nm) na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele: análise clínica e histológica

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos. Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (CTR) (n=20) e LED vermelho (VERM) (n=20), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). A aplicação do LED (630 ±10nm, 300 mW, 9 J/cm² por ponto, 30 segundos) foi realizada em quatro pontos da ferida (total: 36 J/cm²). O consumo de comida dos animais foi mensurado durante os tempos de tratamento. Realizou-se o Índice de Retração da Ferida (IRF), remoção do espécime e os cortes foram submetidos a coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM). Em 7 dias, observou-se que o IRF do CTR foi maior que do VERM ($p=0,01$) e o Índice Angiogênico foi maior no VERM quando comparado ao CTR ($p=0,02$). Em 7, 14 e 28 dias, os animais do grupo tratado consumiram mais ração que o CTR ($p<0,05$). Em 28 dias, ambos os grupos apresentaram predominância de infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve e todos os casos do VERM apresentaram reepitelização completa. Este estudo sugere que o LED, na dosimetria utilizada, contribuiu para a cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele, estimulando em estágios iniciais a reepitelização, angiogênese, atenuação da resposta inflamatória e possíveis efeitos analgésicos.

Palavras-chave: Fototerapia; Queimaduras; Cicatrização; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

Introdução

As queimaduras são lesões traumáticas na pele ou em outros tecidos do corpo, causadas principalmente pelo calor, radiação, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos. Consideradas um grave problema de saúde pública, causam aproximadamente 265.000 mortes por ano no mundo, e são observadas com mais frequência em países de baixa e média renda.

São uma das principais causas de morbidade, desfiguração e incapacidade, gerando muitas vezes grande impacto físico e psicológico nas vítimas [1].

As queimaduras de terceiro grau são lesões graves e que destroem todas as camadas da pele, podendo também atingir músculos, ligamentos, tendões e ossos. São clinicamente brancas ou escurecidas, secas e inelásticas e eventualmente cicatrizam com retração das bordas, deixando deformidades ou cicatrizes [2-4].

Vários tratamentos que acelerem o processo de reparo de feridas vêm sendo foco de diversas pesquisas científicas. Dentre as terapias testadas atualmente estão os tratamentos tópicos com agentes fitoterápicos [5,6], uso de biomateriais [7] e a fototerapia com uso do *Laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou LED (*Light Emitting Diode*) [4, 8-11].

A fotobiomodulação, uma das categorias da fototerapia, envolve a aplicação de uma fonte de luz de baixa potência, não-térmica e não-ablativa, predominantemente o *Laser* ou LED, para estimular ou inibir diretamente processos celulares e biológicos [12-15].

Os resultados promovidos pela fotobiomodulação no processo de reparo estão relacionados com a atenuação da resposta inflamatória [8, 16], aumento da proliferação de fibroblastos [17], estimulação da angiogênese [18, 19], aumento da síntese de colágeno [3, 4], estímulo à reepitelização [20] e efeitos analgésicos [21, 22].

A introdução do LED na fototerapia reduziu algumas preocupações anteriormente associadas aos *Lasers*, simplificando, por exemplo, a fotobiomodulação em grandes áreas da pele [23] e reduzindo os custos de aquisição e tratamento, já que os LEDs são dispositivos mais baratos [12].

O LED vermelho tem a penetração mais profunda (2-3 mm) dos LEDs com comprimentos de onda visíveis e desse modo, é utilizado na fotobiomodulação de estruturas dérmicas, como anexos e fibroblastos [24]. Estudos experimentais com metodologias e protocolos de tratamento diferentes demonstraram eficácia da fototerapia com LED, de diferentes comprimentos de onda, no processo de reparo de queimaduras de terceiro grau em pele [16, 25, 26].

Apesar dos benefícios terapêuticos do LED no tratamento de feridas serem relatados, muitos dos resultados descritos na literatura mostram inconsistências, devido principalmente a vieses de metodologia ou falta de padronização nos estudos. Além disso, o uso do LED como recurso terapêutico continua controverso [27].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação com LED vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 40 ratos machos *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM). Os animais receberam água *ad libitum*, ração padronizada e a temperatura do biotério foi controlada em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro). Foram excluídos os animais que apresentaram qualquer manifestação de doença local ou sistêmica. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) (CIAEP/CONCEA nº: 01.001.2012).

Grupos experimentais

Os 40 animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (CTR) (n=20) e grupo LED vermelho (VERM) (n=20), com subgrupos de 5 ratos para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias após a queimadura).

Tricotomia e queimadura

Todos os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (Cetamin[®], Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (Dopaser[®], Hertape, Juatuba, MG, Brasil) aplicada na região intraperitoneal com seringa para insulina. Constatado plano anestésico profundo, realizou-se a tricotomia em região de dorso, utilizando lâmina de barbear, porta-agulha e solução de digliconato de clorexidina 4% (Riohex[®] 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

A queimadura foi realizada por um único operador devidamente calibrado, com um instrumento metálico de ponta ativa chata, plana e de dimensão de 1 cm³. Esta foi aquecida pelo contato direto com a chama azul de um maçarico por 40 segundos e logo após encostada na

pele do dorso do animal por 20 segundos, segundo metodologia de Meyer e Silva [28], modificada por Catão et al. [4].

Fototerapia

Foi utilizado o equipamento *Bios Therapy II*[®] (Bios Equipamentos Médicos, São José dos Campos, SP, Brasil). O LED foi aplicado de forma contínua (630± 10nm, 300mW, 9 J/cm² por ponto, 30 segundos) em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida (total: 36 J/cm²), diariamente, exceto nos dias de eutanásia. No grupo CTR não foi realizado nenhum tratamento.

Consumo de comida

O consumo de ração foi calculado pela diferença de massa entre dois dias consecutivos, através de uma balança analítica. A cada dois dias, durante os tempos avaliados, a caixa com os animais recebeu uma quantidade de 200g±5g de alimento.

Eutanásia e Índice de Retração da Ferida (IRF)

Após o período experimental, os animais seguiram para eutanásia, sendo alojados em uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com halotano (Tanohalo[®] 1mL/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil). Para a avaliação da retração da ferida, as lesões foram fotografadas após eutanásia com câmera fotográfica digital, a uma distância padronizada de 15 cm e analisadas no programa *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). O IRF foi calculado pela equação: $IRF (\%) = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}}{\text{área inicial}} \times 100$.

Processamento Histológico

Constatada a morte do animal, realizou-se a remoção do espécime com bisturi e tesouras estéreis respeitando uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm. Após fixação em formol a 10%, a amostra foi incluída em parafina e submetida a cortes de 3 µm de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos a métodos rotineiros de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

Avaliação morfológica

Dois examinadores previamente calibrados e de forma cega realizaram a análise morfológica dos casos. O grau de reepitelização das feridas seguiu os critérios adotados por Meireles et al. [29] (tabela 1). Os parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas foram baseados no estudo de Souza et al. [30] (tabela 2). O índice angiogênico foi mensurado pela contagem de vasos em cinco campos ($\times 400$ ampliação) de maior vascularização por espécime segundo Sousa et al. [18]. Cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e nas imagens obtidas contabilizou-se os vasos sanguíneos com auxílio do programa gratuito *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Em sequência, foi estabelecido o número médio de vasos para cada animal. A formação do tecido de granulação e deposição de colágeno de cada subgrupo foram analisadas descritivamente, de forma cega, por dois avaliadores previamente treinados.

Análise Estatística

Para análise estatística, foi utilizado o programa IBM® SPSS Statistics (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O consumo de comida, IRF e IA foram analisados através do teste de Mann-Whitney, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados de reepitelização e resposta inflamatória foram analisados descritivamente.

Resultados

Índice de Retração da Ferida (IRF)

Em 7 dias, as feridas do grupo tratado regrediram menos, com IRF do grupo CTR (mediana: -40%; variação: -60 a -33) superior ao VERM (mediana: -81%; variação: -125 a -43) ($p=0,01$). Após 14 dias, o IRF do grupo CTR (mediana: -17%; variação: -84 a 27) foi inferior ao grupo tratado (mediana: 10%; variação: -35 a 76), porém sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,25$), assim como em 21 dias, com o IRF do CTR (mediana: 77%; variação: 61 – 92) menor que do VERM (mediana: 84%; variação: 76 – 92) ($p=0,36$). No último período,

28 dias, os IRF também foram próximos: grupo CTR (mediana: 96%, variação: 83 – 100) e VERM (mediana: 100%; variação: 91 – 100) ($p=0,43$) (Fig. 1).

Consumo de comida

Em 7, 14 e 28 dias de tratamento, os animais do grupo VERM consumiram mais ração, quando comparados ao grupo CTR, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) (tabela 3).

Reepitelização

Após 7 dias da queimadura, observou-se escore 0 em 60% ($n=3$) dos casos do grupo CTR, enquanto que no VERM, 60% ($n=3$) já apresentavam escore 1. Em 14 dias, o escore 1 foi observado em todos os casos ($n=5$) no grupo CTR e em 80% ($n=4$) no VERM. Verificou-se reepitelização completa (escore 4) em 60% ($n=3$) dos animais do VERM e predominância do escore 2 em 60% ($n=3$) dos casos no CTR, após 21 dias da queimadura. Em 28 dias, 100% ($n=5$) dos animais do grupo VERM apresentaram reepitelização completa (escore 4), enquanto que no CTR, esse percentual foi de 80% ($n=4$) (Fig. 2a). Na maioria dos casos com descontinuidade de epitélio, observou-se crosta seroemática de espessura variável recobrimdo a área da ferida.

Resposta Inflamatória

Em sete dias, ambos os grupos apresentaram predomínio de resposta inflamatória subaguda (escore 4) (Fig. 2b), com infiltrado inflamatório presente tanto nas margens quanto na porção central da ferida, principalmente no tecido conjuntivo fibroso frouxo (Fig. 3a e 3b). Importante dilatação de arteríolas e vênulas pôde ser observada, assim como degeneração das fibras musculares, confirmando a queimadura de terceiro grau.

No período de 14 dias, houve predomínio de resposta inflamatória subaguda (escore 4) nos dois grupos, com a presença de neutrófilos principalmente em áreas mais superficiais da ferida. No grupo VERM, observou-se que 40% ($n=2$) dos animais apresentaram resposta inflamatória crônica moderada (escore 2) (Fig. 2b). Um exuberante tecido de granulação foi

observado em ambos os grupos, com fibroblastos jovens em meio a uma matriz extracelular composta por feixes colágenos delgados e alongados.

Em 21 dias, observou-se infiltrado inflamatório de caráter crônico (escores 1, 2 e 3), em ambos os grupos (Fig. 2b), entre fibras colágenas, mais espessas e mais densamente organizadas, em comparação com o período de 14 dias (Fig. 3c, 3d e 3e). Em 28 dias, ambos os grupos apresentaram predominância de infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve (escore 1) (Fig. 2b). Comparado com o período de 21 dias, as fibras colágenas apresentaram-se mais espessas e mais densamente dispostas na área (Fig. 3e e 3f), após 28 dias.

Índice Angiogênico (IA)

Em 7 dias, observou-se maior IA no grupo VERM (mediana: 6,8; variação: 4,8 - 7,6) quando comparado ao CTR (mediana: 2,4; variação: 0,6 - 8,6) ($p=0,02$). Em 14 dias, o IA do grupo VERM (mediana: 4,80; variação: 0,6 - 7,8) também foi superior ao CTR (mediana: 4,2; variação: 3,0 - 5,4), porém sem diferença estatística significativa ($p=0,91$). Após 21 dias da queimadura, notou-se que o IA foi maior no CTR (mediana: 5,2; variação: 2,4 - 9,8) quando comparado ao grupo VERM (mediana: 3,2; variação: 1,8 - 6,2) ($p=0,04$) (Fig. 3c e 3d). Em 28 dias, o grupo VERM também apresentou IA inferior (mediana: 2,8; variação: 0,4 - 7,4) ao CTR (mediana: 3,8; variação: 1,8 - 7,2), mas sem diferença estatística significativa ($p=0,46$) (Fig. 4).

Discussão

Estudos experimentais que avaliaram *in vivo* a eficácia da fotobiomodulação com LED vermelho no reparo de queimaduras de terceiro grau são escassos na literatura, mas efeitos importantes dessa técnica já são relatados, como a atenuação no número de células inflamatórias [31] significativa redução da área da ferida, aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno[25]. Deve-se considerar que há uma diversidade de protocolos adotados nas pesquisas com fototerapia, o que dificulta a comparação de resultados. A maioria dos estudos utilizaram os *Lasers* em baixa intensidade como fonte luminosa.

Apesar do LED não ser uma luz coerente, estudos apontam que os efeitos fotoquímicos nos tecidos acontecem independente da coerência da luz, já que essa propriedade é perdida logo

no primeiro extrato da pele, antes da luz ser absorvida pelos cromóforos, não sendo determinante, portanto, no resultado do tratamento [18, 32].

Sugere-se que o maior consumo de comida nos grupos tratados com LED observado neste estudo pode ser decorrente de possíveis efeitos analgésicos, já que todos os animais foram padronizados e estavam sob mesmas condições de alojamento. Relatos semelhantes foram apontados por Catão et al. [4] ao avaliarem os efeitos dos *Lasers* em baixa intensidade e do LED verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos.

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que a luz em baixa intensidade pode inibir a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), evitando conseqüentemente a liberação de prostaglandinas, causando assim alívio aos sintomas da inflamação e da dor [33,34].

Observou-se que apesar das feridas em 14, 21 e 28 dias regredirem mais no grupo tratado, não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo CTR. Fiório et al. [31] ao avaliar a regressão de queimaduras de terceiro grau em ratos, observaram que no 8º dia após a lesão, a diferença entre as áreas da ferida para o grupo tratado (640 nm, 30 mW, 4 J/cm²) e não tratado não foi estatisticamente significativa. Entretanto, no 16º dia, o tratamento com LED reduziu significativamente a área da ferida em comparação com o grupo não tratado. Cabe destacar que no estudo de Fiório et al. [31] as doses utilizadas foram mais baixas e houve intervalos de 48 horas entre uma aplicação e outra.

Apesar de muitos mecanismos de ação permanecerem desconhecidos, estudos *in vitro* [35,36] têm demonstrado que aplicações de luz em baixa intensidade regula a migração e proliferação de queratinócitos, células responsáveis por recobrir a área de injúria e estimular no tecido conjuntivo subjacente a expressão de fatores de crescimento. Como o epitélio é um dos primeiros tecidos a ser irradiado durante o tratamento das lesões, terapias que possam bioestimular a proliferação de células epiteliais podem ter um efeito benéfico na cicatrização de tecidos.

O estudo de Sousa et al. [18] encontrou resultado semelhante ao deste estudo, ao avaliar histologicamente a angiogênese em feridas cutâneas dorsais tratadas com LED em ratos machos *Wistar*, e observar que o LED vermelho ($\lambda 700 \pm 20$ nm) causou um aumento significativo da angiogênese em 7 dias quando comparado com o grupo controle, concluindo que o LED é capaz de estimular a angiogênese em feridas cutâneas *in vivo*. Diferente do presente estudo, os autores não avaliaram tempos superiores a 7 dias.

Há relatos de que a fotobiomodulação induz a angiogênese em feridas crônicas por estimular o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [37, 38]. A restauração da microcirculação no local da queimadura com a formação de vasos sanguíneos é essencial para

a cicatrização e reparo da área lesada, pois além de ser um meio de condução celular, fornece oxigênio e nutrientes aos tecidos, permitindo assim a proliferação celular e deposição de colágeno [39, 40].

Após 21 dias, verificou-se menor número de vasos sanguíneos no grupo CTR. Uma das possíveis explicações para este fato é de que o LED tenha acelerado a cicatrização das feridas, e portanto, em 21 e 28 dias após a queimadura, o número de vasos sanguíneos tenha sido inferior no grupo VERM, quando comparado ao CTR, já que no processo de cicatrização, o número de vasos diminui a medida que o tecido avança para estágios mais maduros [39,41]. Deve-se considerar também que em 21 dias, 80% (n=4) dos animais do grupo CTR ainda não tinham atingido reepitelização completa, permanecendo com a superfície da ferida descoberta, o que poderia justificar também esse aumento do número de vasos no grupo CTR.

A fototerapia com LED é um campo de pesquisa promissor, que ainda não atingiu todo seu potencial, cujos protocolos e dados publicados devem ser melhor explorados. Assim, mais estudos devem ser executados, inclusive com diferentes comprimentos de onda, para que sejam encaminhadas orientações definitivas da prática. À medida que o uso do LED se expandir e suas indicações se tornarem melhor definidas, tratamentos mais eficazes estarão disponíveis (OPEL, 2015) [24].

Neste estudo, foi avaliado os efeitos da irradiação LED de apenas um comprimento de onda de luz, único tempo de exposição e dose. Estudos adicionais que avaliem diferentes comprimentos de onda, potências e durações de irradiação diferentes serão importantes para identificar o melhor método de fotobiomodulação no tratamento de queimaduras de terceiro grau em pele.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, as tendências por eles revelados e as limitações das técnicas histoquímicas utilizadas no mesmo, sugere-se que futuras pesquisas sejam realizadas a fim de avaliar com mais detalhes os efeitos do LED vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele.

Conclusões

Em conclusão, este estudo sugere que o LED vermelho, na dosimetria utilizada, contribuiu de forma positiva na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele, estimulando em estágios iniciais a reepitelização, angiogênese, atenuação da resposta inflamatória e possíveis efeitos analgésicos. Com base nos achados desta pesquisa, estudos

futuros serão importantes para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da fotobiomodulação desse tipo de LED na cicatrização dessas injúrias.

Referências

1. World Health Organization (2016) Burns. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>. Accessed 20 de Mar 2017.
2. Moraes JM, Mendonça DEO, Moura VB, Oliveira MA, Afonso CL, Vinaud MC, Bachion MM, Lino Jr RS. (2013) Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. *Lasers Med Sci* 28:1169-1176. doi: 10.1007/s10103-012-1213-1
3. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior EC, 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 Med Sci* 29:313-319. doi: 10.1007/s10103-013-1341-2
4. Catão MHCV, Nonaka CFW, Albuquerque Jr RLC, Bento PM, Oliveira RC (2015) Effects of red laser, infrared, photodynamic therapy, and green LED on the healing process of third-degree burns: clinical and histological study in rats. *Lasers Med Sci* 30:421-428. doi: 10.1007/s10103-014-1687-0
5. Akhoondinasab MR, Khodarahmi A, Akhoondinasab M, Saberi M, Iranpour M (2015) Assessing effect of three herbal medicines in second and third degree burns in rats and comparison with silver sulfadiazine ointment. *Burns* 41:125-131. doi: 10.1016/j.burns.2014.04.001
6. Bejenaru C, Mogoşanu GD, Bejenaru LE, Biţă A, Bălşeanu TA, Ionică FE (2016) Effect of *Scutellariae herba* extracts in experimental model of skin burns: histological and immunohistochemical assessment. *Rom J Morphol Embryol* 57:1285–1294
7. Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M (2017) Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol* 102:380-383. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047
8. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, Singh SB (2015) Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics* 8:489-501. doi: 10.1002/jbio.201400058
9. Trajano ETL, Trajano LA, Silva MAS, Venter NG, Porto LC, Fonseca A, Monte-Alto-Costa A (2015) Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. *Lasers Med Sci* 30:1297-1304. doi: 10.1007/s10103-015-1729-2
10. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L et al (2016) Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound

- healing third-degree burns in rats. *Microsc Res Tech* 79:313-320. doi: 10.1002/jemt.22632
11. Gomes MT, Campos GR, Piccolo N, França CM, Guedes GH, Lopes F et al (2017) Experimental burns: Comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation. *Rev Assoc Med Bras* 63: 29-34. doi: 10.1590/1806-9282.63.01.29
 12. 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.
 13. Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201
 14. Yadav A, Gupta A (2017) Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 33: 4-13. doi:10.1111/phpp.12282
 15. Hadis MA, Cooper PR, Milward MR, Gorecki PC, Tarte E, Churm J, Palin WM (2017) Development and application of LED arrays for use in phototherapy research. *J Biophotonics*. doi: 10.1002/jbio.201600273.
 16. Catão MHCV, Costa RO, Nonaka CFW, Albuquerque Junior RLC, Costa IRRS (2016) Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. *Burns* 42:392-396. doi: 10.1016/j.burns.2015.07.003
 17. Sousa AP, Santos JN, Reis JR JA, Ramos TA, Souza J, Cangussú MC, Pinheiro AL (2010). Effect of led phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. *Photomed Laser Surg* 28: 547-552. doi: 10.1089/pho.2009.2605
 18. Sousa AP, Paraguassú GM, Silveira NT, Souza J, Cangussú MC, Santos JN, Pinheiro AL (2013) Laser and LED phototherapies on angiogenesis. *Lasers Med Sci* 28: 981-987. doi: 10.1007/s10103-012-1187-z
 19. Medeiros ML, Araújo-Filho I, Silva EMN, Queiroz WSS, Soares CD, Carvalho MGF, Maciel MAM (2016) Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci* 32: 35-43. doi: 10.1007/s10103-016-2080-y
 20. Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S (2012) Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen* 20: 226-235. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x.

21. Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. (2010) Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol* 85:849-855.
22. Fabre HSC, Navarro RL, Oltramari-Navarro PVP, Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Andraus RAC et al (2015) Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. *J Phys Ther Sci* 27: 1645–1648. doi: 10.1589/jpts.27.1645
23. Kim WS, Calderhead RG (2011) Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther* 20: 205–215. doi: 10.5978/islsm.20.205
24. Opel DR, Hagstrom E, Pace AK, Sisto K, Hirano-Ali SA, Desai S, Swan J (2015) Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience. *J Clin Aesthet Dermatol* 8:36-44.
25. Neves SM, Nicolau RA, Filho AL, Mendes LM, Veloso AM (2014) Digital photogrammetry and histomorphometric assessment of the effect of non-coherent light (light-emitting diode) therapy (1640±20 nm) on the repair of third-degree burns in rats. *Lasers Med Sci* 29:203-212. doi: 10.1007/s10103-013-1312-7
26. Fekrazad R, Nikkerdar A, Joharchi K, Kalhori KA, Abbas FM, Vahid FS (2017) Evaluation of therapeutic laser influences on the healing of third-degree burns in rats according to different wavelengths. *J Cosmet Laser Ther.* 6:1-5. doi: 10.1080/14764172.2017
27. Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M (2014) Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol* 89: 616–623. doi: 10.1590/abd1806-4841.20142519
28. Meyer TN, Silva AL (1999) A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras.* doi: 10.1590/S0102-86501999000400009
29. 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* 26:47-54. doi: 10.1089/pho.2007.2051
30. Souza ICL, Nascimento MF, Souza Neta RG, Santos JC, Costa LP, Cardoso JC, Albuquerque-Júnior RLC (2013) Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Int J Med Sci* 5: 514-524. doi: 10.5897/IJMMS2013.0950
31. Fiório FB, Silveira Júnior L, Munin E, Lima CJ, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA et al (2011) Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *J Cosmet Laser Ther* 13:315-322. doi: 10.3109/14764172.2011.630082

32. Agnol MAD, Nicolau RA, Lima CJ, Munin E (2009) Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci* 24: 909-916. doi: 10.1007/s10103-009-0648-5
33. Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med* 39: 614-621. doi: 10.1002/lsm.20533
34. Rocha CLJV, Rocha Júnior AM, Aarestrup BJV, Aarestrup FM (2012) Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in NOD mice cutaneous wound by low-level laser therapy. *J Vasc Bras* 11:175–181. doi: 10.1590/S1677-54492012000300002
35. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA (2013) Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci* 28:367-374. doi: 10.1007/s10103-012-1057-8
36. Huang C, Qian SL, Sun LY, Cheng B (2016) Light-emitting diode irradiation (640nm) regulates keratinocyte migration and cytoskeletal reorganization via hypoxia-inducible factor-1a. *Photomed Laser Surg*. 34::313-320. doi: 10.1089/pho.2015.4077
37. Cury V, Moretti AI, Assis L, Bossini P, Crusca JS, Benatti Neto C et al (2013) Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B* 125: 164–170. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004
38. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B 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*. 64:387-391.
39. Busuioc CJ, Popescu FC, Mogoşanu GD, Lascăr I, Pirici I, Pop OT, Mogoantă L (2011) Angiogenesis assessment in experimental third degree skin burns: a histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 52: 887-95.
40. Colombo F, Valença Neto AAP, Sousa APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRA (2013) Effect of low-level laser therapy (1660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. *Braz. Dent. J* 24: 308-312. doi: 10.1590/0103-6440201301867
41. Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K (2014) The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/747584

Tabela 1 Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (Meireles et al., 2008)

Escores	Descrição
0	Ausente
1	Presente, cobrindo <50% da ferida
2	Presente, cobrindo >50% da ferida
3	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular
4	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular

Tabela 2 Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (Souza et al., 2013)

Escore da resposta inflamatória	Semiquantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Leve	
2	Moderada	Crônica (predominância de linfócitos e histiócitos)
3	Intensa	
4	Intensa	Subaguda (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos)
5	Intensa	Aguda (predominância de neutrófilos)

Tabela 3 Comparação do consumo de ração por animal entre os grupos experimentais

Grupo	Consumo de ração (gramas) /mediana	Valores Mínimo - Máximo	<i>p</i>*
CTR 7	33,24	30,36 - 33,75	0,05
VERM 7	36,84	34,00 - 37,26	
CTR 14	31,63	29,22 – 34,32	0,01
VERM 14	35,46	32,20 – 38,45	
CTR 21	36,56	31,05 – 40,00	0,325
VERM 21	37,34	29,09 – 40,12	
CTR 28	32,51	28,03 – 35,66	<0,01
VERM 28	40,00	31,70 – 40,18	

* $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significativas

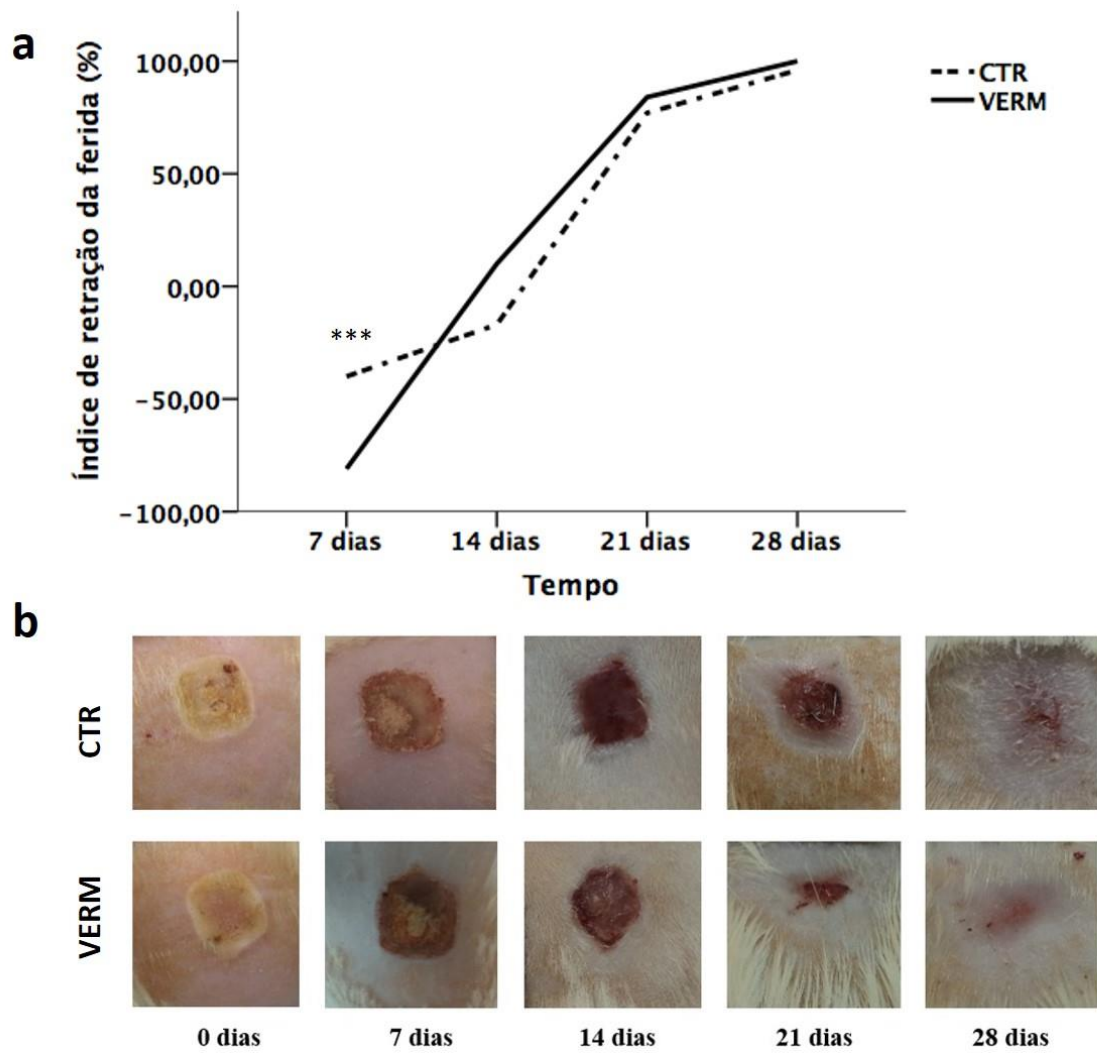


Fig. 1 Regressão das queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). **a** Índice de Retração da Ferida (IRF) das queimaduras. *** Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). **b** Regressão clínica das feridas até 28 dias após a queimadura

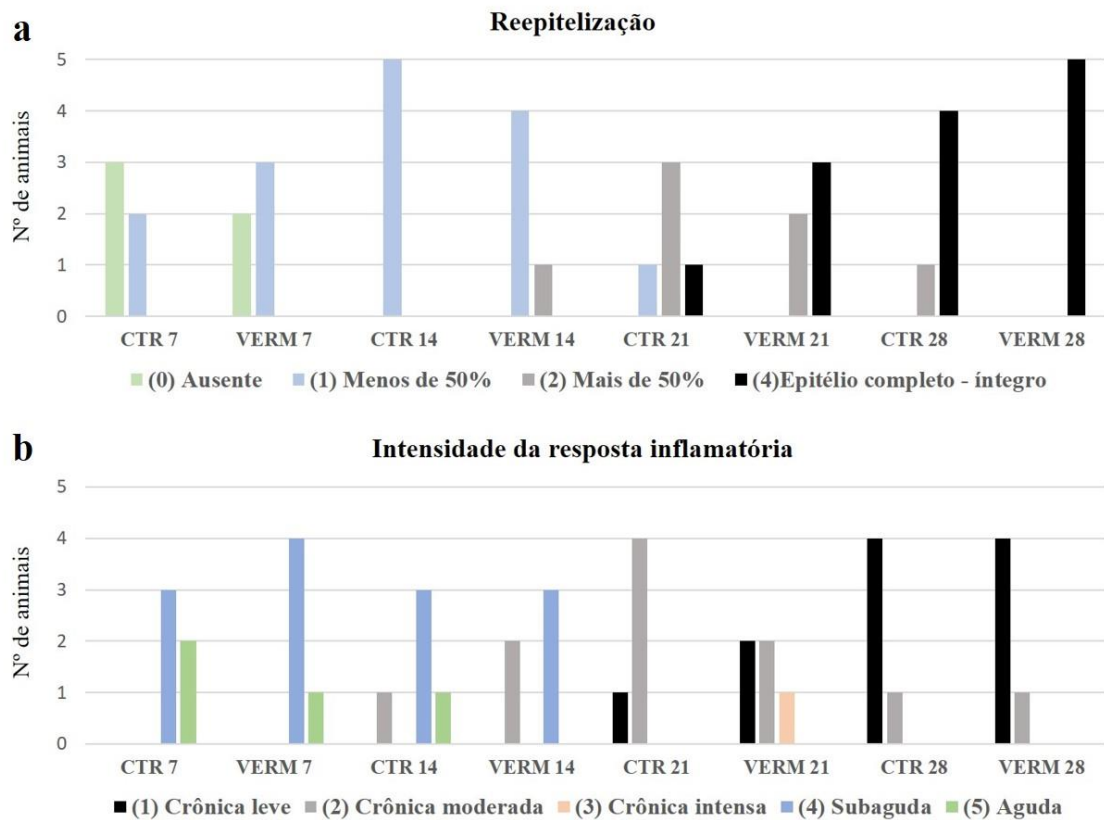


Fig. 2 Reepitelização e intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). **a** Distribuição absoluta dos casos quanto aos escores de reepitelização das feridas. **b** Distribuição absoluta dos casos quanto a intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras

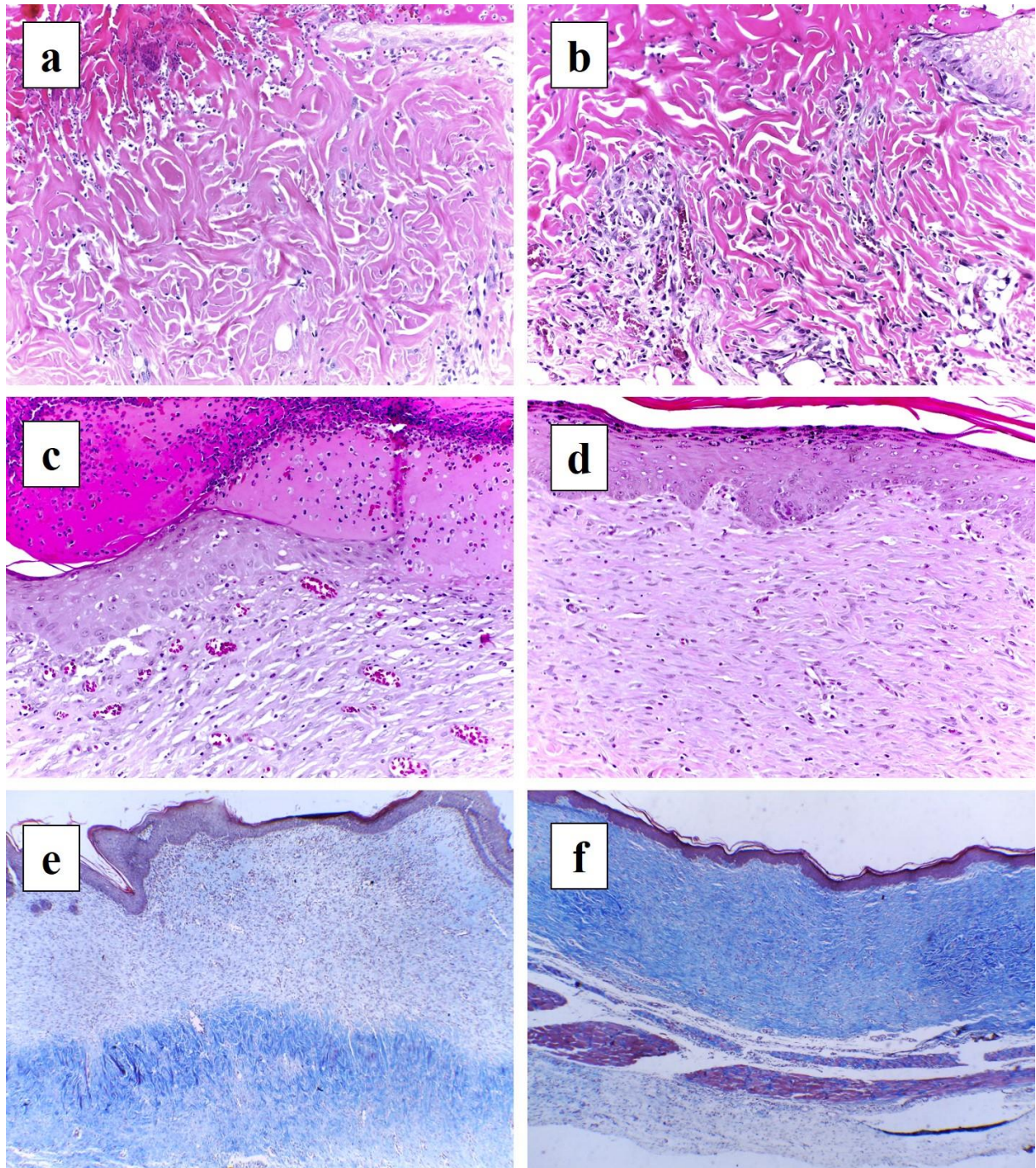


Fig. 3 Avaliação histológica das feridas em diferentes períodos. **a** Aspecto da ferida do grupo CTR em 7 dias, com áreas de necrose tecidual e presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e histiócitos) (HE, 200x) **b** Início de reepitelização da ferida do grupo VERM em 7 dias, com presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e histiócitos) e vasos sanguíneos no tecido conjuntivo (HE, x200). **c** Ferida em processo de reepitelização do grupo CTR, após 21 dias, com presença de crosta seroemática recobrendo a região e grande número de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo (HE; x200). **d** Aspecto da ferida do grupo VERM, em 21 dias, com menor número de vasos sanguíneos dispostos no tecido conjuntivo (HE, x200)

e Reepitelização completa da ferida e tecido conjuntivo (TM, x100). f Reepitelização completa e tecido conjuntivo mais maduro, com fibras colágenas mais densas e organizadas, no local da ferida após 28 dias da queimadura (TM, x40)

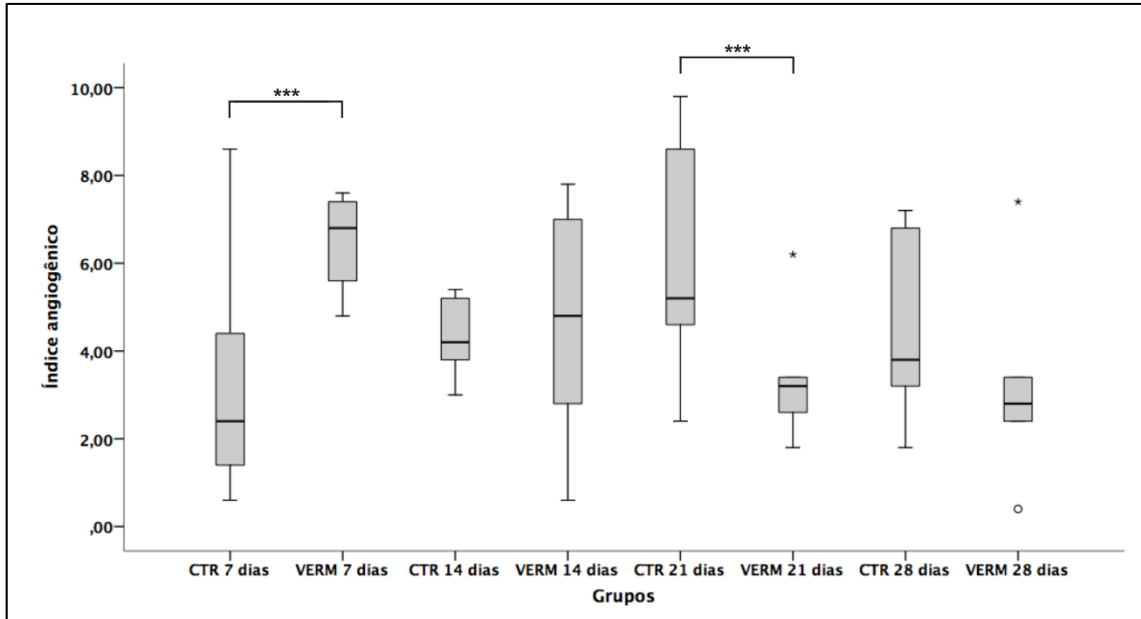


Fig. 4 Gráfico box-plot do índice angiogênico nas queimaduras de terceiro grau em pele de acordo com o grupo e tempos de eutanásia. *** Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4.3 ARTIGO 2

LED azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele: avaliação clínica e histológica

Objetivo: Avaliar os efeitos do Diodo Emissor de Luz (LED) azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos. **Métodos:** Utilizou-se 40 ratos *Wistar*, machos, divididos em dois grupos: controle (CTR) (n=20) e LED azul (AZUL) (n=20), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). Aplicou-se LED (470 nm, 1W, 12,5 J/cm² por ponto, 28 segundos) em quatro pontos da ferida (total: 50 J/cm²). O consumo de comida dos animais foi mensurado a cada dois dias. **Resultados:** Não houve diferenças estatisticamente significativas no Índice de Retração da Ferida (IRF) do AZUL com relação ao CTR ($p>0,05$), nos tempos avaliados. Passados 14, 21 e 28 dias, observou-se que os animais do grupo AZUL consumiram mais ração que o CTR ($p<0,05$). Em 7 dias, observou-se um aumento estatisticamente significativo do Índice Angiogênico (IA) no AZUL (mediana: 6,2) quando comparado ao CTR (mediana: 2,4) ($p=0,01$) e todos os animais do AZUL já haviam iniciado a reepitelização. **Conclusões:** Este estudo sugere que o LED azul, na dosimetria utilizada, tenha contribuído positivamente em etapas importantes e iniciais da cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

Palavras-chave: Fototerapia; Queimaduras; Cicatrização; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

1. Introdução

As queimaduras são consideradas um grave problema de saúde pública, causando aproximadamente 265.000 mortes por ano em todo o mundo. São uma das principais causas de morbidade, hospitalização prolongada, desfiguração e incapacidade, deixando muitas vezes grande impacto físico e psicológico nas vítimas [1].

Terapias que acelerem o processo de reparo, aumentem a qualidade de vida do paciente e reduzam custos de tratamento, vem sendo foco de diversas pesquisas científicas. Dentre os métodos terapêuticos testados atualmente está a fotobiomodulação com uso do LED (*Light Emitting Diode*) [2-4].

O completo mecanismo de ação da fotobiomodulação não está totalmente claro, mas sabe-se que a luz em baixa intensidade pode interagir com células, levando a mudanças nos níveis molecular, celular e tecidual. Cada tecido, no entanto, responde a essa interação de maneira diferente [5] a partir que a luz é absorvida ou não por moléculas do tecido alvo que são denominadas de cromóforos ou fotorreceptores.

Estudos apontam que os efeitos da luz nos tecidos acontecem independente da coerência da luz, já que essa propriedade é perdida no primeiro extrato da pele, antes da luz ser absorvida pelos cromóforos, não sendo determinante, portanto, no resultado do tratamento [6-7].

Os efeitos biológicos promovidos por essa terapia no processo de reparo encontrados na literatura estão relacionados com a atenuação da resposta inflamatória [4, 8], aumento da proliferação de fibroblastos [9], estimulação da angiogênese [7, 10], aumento da síntese de colágeno [3, 11], estímulo à reepitelização [12] e efeitos analgésicos [13, 14].

Apesar do LED azul (400-470nm) ter penetração no tecido de aproximadamente 1 mm, tendo como alvo mais profundo a epiderme [15], pesquisas têm avaliado os efeitos *in vivo* dessa luz na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele [16, 17].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação do LED azul na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Utilizou-se 40 ratos *Wistar*, clinicamente saudáveis, *com idade* entre 60 e 90 dias, peso entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) em Campina Grande/PB. Os animais receberam água *ad libitum*, ração padronizada e a temperatura do biotério foi 12 horas de ciclo claro/escuro). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) (CIAEP/CONCEA nº: 01.001.2012). Os 40 animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (CTR) (n=20) e grupo LED (AZUL) (n=20), com subgrupos de 5 ratos para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias após a queimadura).

2.2 Anestesia/tricotomia/queimadura

Todos os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (Cetamin[®], Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (Dopaser[®], Hertape, Juatuba, MG, Brasil), aplicada em região intraperitoneal com seringa para insulina. Constatado o plano anestésico profundo, posicionou-se os animais em decúbito ventral e realizou-se a tricotomia em região de dorso, utilizando lâmina de barbear, porta-agulha e solução de digliconato de clorexidina 4% (Riohex[®] 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). A queimadura foi realizada por um único operador devidamente calibrado, com um instrumento metálico de ponta ativa chata, plana e de dimensão de 1 cm³. Esta foi aquecida pelo contato direto com a chama azul de um maçarico por 40 segundos e logo após encostada na pele do dorso do animal por 20 segundos, segundo metodologia de Meyer e Silva [18], modificada por Catão et al. [3]

2.3 Aplicação do LED

Utilizou-se o equipamento *Easy Bleach*[®] (Clean Line Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos LTDA, Taubaté, São Paulo, Brasil). O LED foi aplicado de forma contínua (470 nm, 1 W, 12,5 J/cm² por ponto, 28 segundos) em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida (total: 50 J/cm²), diariamente, exceto nos dias da eutanásia do animal. O grupo CTR não recebeu nenhum tratamento.

2.4 Consumo de comida

O consumo de ração foi calculado pela diferença de seu peso entre dois dias consecutivos, através de uma balança analítica. A cada dois dias, durante os tempos avaliados, a caixa com os animais recebeu uma quantidade de 200g±5g de alimento.

2.5 Eutanásia/ Índice de Retração da Ferida (IRF)/ processamento histológico

Após o período experimental de cada subgrupo, os animais seguiram para eutanásia, sendo alojados em uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com halotano (Tanohalo[®] 1mL/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil). Após eutanásia, as lesões foram fotografadas com câmera fotográfica digital, a uma distância padronizada de 15 cm, com auxílio de um tripé, e as imagens foram analisadas no programa *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). A ferida foi detalhadamente contornada por um único

avaliador, de forma cega, e o IRF foi calculado pela equação: $IRF (\%) = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}}{\text{área inicial}} \times 100$. Realizou-se a remoção do espécime com bisturi respeitando uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm. Após fixação em formol a 10%, a amostra foi incluída em parafina e submetida a cortes de 3 μm de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos a métodos rotineiros de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE).

2.6 Avaliação histológica

Dois examinadores previamente calibrados e de forma cega realizaram a avaliação do grau de reepitelização das feridas seguindo os critérios adotados por Meireles et al. [19] (tabela 1). Os parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas foram baseados no estudo de Souza et al. [20] (tabela 2). O índice angiogênico foi mensurado pela contagem de vasos em cinco campos ($\times 400$ ampliação) de maior vascularização por espécime [7]. Cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e nas imagens obtidas contabilizou-se os vasos sanguíneos com auxílio do programa *Image J* versão 1.50i (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*). Em sequência, foi estabelecido o número médio de vasos para cada animal. A formação do tecido de granulação e deposição de colágeno de cada subgrupo foram analisadas descritivamente.

2.7 Análise Estatística

Utilizou-se teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. O consumo de comida, do IRF e da IA foram analisados através do teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados de reepitelização e resposta inflamatória foram analisados descritivamente. O programa IBM® SPSS Statistics (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA) foi utilizado para as análises.

3. Resultados

3.1 Índice de Retração da Ferida (IRF)

Não houve diferenças estatisticamente significativas no IRF entre os grupos AZUL e CTR ($p>0,05$), nos tempos avaliados (Tabela 3). Os aspectos clínicos da retração das queimaduras de ambos os grupos em 7, 14, 21 e 28 dias podem ser vistos na Fig.1.

3.2 Consumo de comida

Passados 14, 21 e 28 dias, observou-se que os animais do grupo AZUL consumiram mais ração, que os dos grupos CTR, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) (tabela 4).

3.3 Reepitelização

Após 7 dias da queimadura, observou-se o início de reepitelização das feridas (escore 1) em 100% (n=5) dos animais do grupo AZUL, enquanto que no CTR, 60% (n=3) dos casos esse processo ainda não havia iniciado (escore 0). Em 14 dias, o escore 1 foi observado em 100% (n=5) no grupo CTR e em 80% (n=4) dos animais do grupo tratado, verificou-se um estágio de reepitelização mais avançado (escore 2). Em 21 dias, observou-se que o escore 2 ainda foi predominante em 60% (n=3) e 80% (n=4) dos casos, nos grupos CTR e AZUL, respectivamente. No último período de avaliação, 28 dias, enquanto que 80% (n=4) das feridas do CTR foram reepitelizadas completamente (escore 4), no grupo AZUL, todos os casos (n=5) permaneceram no escore 2 (Fig. 2a). Em feridas com descontinuidade de epitélio, observou-se com frequência presença de crosta seroemática de espessura variável recobrimdo a região

3.4 Tecido de granulação/ infiltrado inflamatório

Em 7 dias, ambos os grupos apresentaram predomínio de resposta inflamatória aguda (escore 5) e subaguda (escore 4) (Fig. 2b), com infiltrado inflamatório presente em toda a região da ferida. Dilatação de arteríolas e vênulas pôde ser observada, assim como degeneração de fibras musculares (Fig. 3a e 3b).

Passados 14 dias da queimadura, houve predomínio de resposta inflamatória subaguda (escore 4) nos dois grupos, com presença de neutrófilos principalmente em áreas superficiais da lesão. No AZUL, observou-se que 40% (n=2) dos animais apresentaram resposta inflamatória crônica moderada (escore 2) (Fig.2b). Exuberante tecido de granulação foi observado em ambos os grupos, com fibroblastos jovens e vasos sanguíneos neoformados em meio a uma matriz extracelular composta por feixes colágenos delgados e alongados.

Em 21 dias, observou-se infiltrado inflamatório de caráter crônico moderado nos dois grupos (Fig.2b, 3c e 3d). Em comparação com 14 dias, as fibras colágenas apresentaram-se mais espessas e mais densamente organizadas.

No último período de avaliação, 28 dias, ambos os grupos apresentaram predominância de infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve (escore 1) (Fig. 2b, 3e e 3f). Em 60% (n=3) dos casos do AZUL, o tecido conjuntivo guardava muita semelhança ao tecido encontrado em 21 dias, com predomínio de fibras colágenas mais delgadas e células dispostas de forma mais aleatória na matriz extracelular.

3.5 Índice Angiogênico (IA)

Em 7 dias, observou-se um aumento estatisticamente significativo do IA no grupo AZUL (mediana: 6,2; variação: 4,6 – 9,8) quando comparado ao CTR (mediana: 2,4; variação: 0,6 – 8,6) ($p=0,01$) (Fig. 3a e 3b). Nos demais tempos de avaliação, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$) (Fig. 4). Em 14 dias, o IA do grupo AZUL (mediana: 4,80; variação: 0,6 – 7,8) foi superior ao CTR (mediana: 4,2; variação: 3,0 – 5,4) ($p=0,83$). Após 21 dias, o IA de ambos os grupos assumiram valores iguais: AZUL (mediana: 5,2; variação: 2,8 – 9,4) e CTR (mediana: 5,2; variação: 2,4 – 9,8) ($p=1,00$). Em 28 dias, o grupo AZUL apresentou IA inferior (mediana: 3,2; variação: 2,4 – 8,8) quando comparado ao grupo CTR (mediana: 3,8; variação: 1,8 – 7,2) ($p=0,83$).

4. Discussão

A introdução do LED na fototerapia reduziu algumas preocupações anteriormente associadas aos *Lasers*, simplificando, por exemplo, a fotobiomodulação em grandes áreas da pele (KIM; CALDERHEAD, 2011) e reduzindo os custos de aquisição e tratamento, já que os LEDs são gerados em dispositivos mais baratos [21].

Neste estudo, observou-se que o LED azul estimulou a proliferação de vasos sanguíneos no período de 7 dias. Não foram encontrados na literatura, outros estudos que avaliaram os efeitos desse LED na angiogênese durante o processo de reparo de queimaduras em pele, porém há relatos de que fotobiomodulação influencia a proliferação de células endoteliais [22]. Dungal et al.[23] observaram que terapia de luz em baixa intensidade com LED de diferentes comprimentos de onda (azul e vermelho) induz a angiogênese e melhora a cicatrização de feridas isquêmicas.

Ao analisar a ferida 7 e 14 dias após a queimadura, verificou-se IRF negativos em ambos os grupos. Isso possivelmente se deve ao edema intersticial gerado, o que aumenta as dimensões macroscópicas das feridas, como apontado por Catão et al. [3]. Em 21 e 28 dias, notou-se que as feridas regrediram, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, possivelmente devido a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos, além da redução do edema e vascularização.

O fenômeno chave da contração da ferida é a diferenciação fenotípica dos fibroblastos preexistentes, em miofibroblastos, caracterizados pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) que concede a essas células a propriedade de contrair-se, e conseqüentemente, contrair o tecido. Geralmente ocorre a partir da segunda semana de cicatrização, onde os fibroblastos se tornam as populações mais numerosas de células no tecido de granulação [24, 25].

Fekrazad et al. [17] ao estudar os efeitos do LED azul (405 nm, 1,5 J/cm², 21 dias) na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos, também não encontraram diferenças estatisticamente significativas na retração da ferida, entre o grupo tratado e controle.

Sousa et al. [9] avaliaram histologicamente a proliferação fibroblástica em feridas cutâneas dorsais em ratos tratados diariamente com LEDs de três comprimentos de onda (vermelho, verde e azul) por 7 dias e observaram que o LED azul (460±20 nm, 22 mW, 10J/cm²) não mostrou aumento significativo na proliferação de fibroblastos quando comparado com o controle, ao contrário dos outros dois comprimentos de onda.

Estudos *in vitro* [26,27,28] têm apontado que o LED azul pode inibir, de uma forma dose-dependente, a proliferação e velocidade de migração dos fibroblastos dérmicos. Porém, mais estudos, *in vitro* e *in vivo*, são necessários para um maior esclarecimento do assunto.

O estudo de Adamskaya et al. [12] investigou *in vivo* os efeitos do LED azul (470 nm, 1W, 50 mW/cm²) em feridas cutâneas de ratos e observou que a luz reduziu significativamente o tamanho da ferida em 7 dias e estimulou fortemente a reepitelização. Os achados no presente

estudo sugerem que a reepitelização nos animais tratados tenha sido estimulada pelo LED nos primeiros dias, já que a mesma, em 7 dias, iniciou-se em todas as feridas do grupo AZUL.

É importante pontuar que os resultados contrastantes sobre fototerapia encontrados na literatura, podem ser justificados pela falta de padronização dos protocolos, já que os estudos utilizam equipamentos, doses, comprimentos de onda, tempos de irradiação e potências diferentes, o que dificulta assim, a comparação dos dados. Os efeitos biológicos são dependentes dos parâmetros de aplicação, especialmente do comprimento de onda da luz e dose aplicada, destacando-se, assim, a importância da determinação de um protocolo apropriado antes de qualquer tratamento [29].

O maior consumo de ração nos grupos tratados observado nesse estudo pode sugerir possíveis efeitos analgésicos e anti-inflamatórios do LED, já que todos os animais (CTR e AZUL) foram padronizados quanto sexo, idade, peso e mantidos sob mesmas condições de alojamento. Relatos semelhantes foram apontados por Catão et al. [3] ao avaliarem os efeitos dos *Lasers* e LED verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele. Estudos demonstraram que a fototerapia pode inibir a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), evitando assim a liberação de prostaglandinas, gerando alívio aos sintomas da inflamação e da dor [30, 31].

Considerando as limitações das técnicas histoquímicas utilizadas neste estudo, sugere-se que pesquisas futuras sejam realizadas, a fim de avaliar com mais detalhes os efeitos fotobiomoduladores do LED azul no processo de reparo de queimaduras de terceiro grau em pele.

5. Conclusão

Com base nos achados deste estudo, sugere-se que o LED azul tenha estimulado etapas importantes da cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele, como a reepitelização e angiogênese nos períodos iniciais, acompanhadas de possíveis efeitos analgésicos. Entretanto, estudos futuros são necessários para compreender com maior clareza os efeitos fotobiomoduladores desse LED no reparo dessas lesões.

Referências

- [1] World Health Organization. WHO Burns. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>; 2016 [Accessed 30.03.17]
- [2] Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen* 2012; 20:226-35.
- [3] Catão MHCV, Nonaka CFW, Albuquerque Jr RLC, Bento PM, Oliveira RC. Effects of red laser, infrared, photodynamic therapy, and green LED on the healing process of third-degree burns: clinical and histological study in rats. *Lasers Med Sci* 2015; 30:421-8.
- [4] Catão MHCV, Costa RO, Nonaka CFW, Albuquerque Junior RLC, Costa IRRS. Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. *Burns* 2016; 42:392-6.
- [5] Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>.
- [6] Agnol MAD, Nicolau RA, Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 909-16.
- [7] Sousa AP, Paraguassú GM, Silveira NT, Souza J, Cangussú MC, Santos JN et al. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 981-7.
- [8] Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics* 2015; 8:489-501.
- [9] Sousa AP, Santos JN, Reis JR JA, Ramos TA, Souza J, Cangussú MC et al. Effect of led phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 547-52.

- [10] Medeiros ML, Araújo-Filho I, Silva EMN, Queiroz WSS, Soares CD, Carvalho MGF et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci* 2016; 32: 35-43.
- [11] Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior EC, Carvalho PT. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci* 2014; 29:313-19.
- [12] Adamskaya N, Dungal P, Mittermayr R, Hartinger J, Feichtinger G, Wassermann K. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury* 2011; 42: 917-21.
- [13] Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol* 2010; 85:849-55.
- [14] Fabre HSC, Navarro RL, Oltramari-Navarro PVP, Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Andraus RAC et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. *J Phys Ther Sci* 2015; 27:1645–8.
- [15] Opel DR, Hagstrom E, Pace AK, Sisto K, Hirano-Ali SA, Desai S et al. Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience. *J Clin Aesthet Dermatol* 2015; 8:36-44.
- [16] Fekrazad R, Nikkerdar A, Joharchi K, Kalhori KAM, Abbas FM (2014) Effect of laser photostimulation on the healing of third-degree burn wounds in rats. *J Arch Mil Med*. <https://doi.org/10.5812/jamm.22315>.
- [17] Fekrazad R, Nikkerdar A, Joharchi K, Kalhori KA, Abbas FM, Vahid FS Evaluation of therapeutic laser influences on the healing of third-degree burns in rats according to different wavelengths. *J Cosmet Laser Ther* 2017; 6:1-5.
- [18] Meyer TN, Silva AL (1999) A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras*. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-86501999000400009>
- [19] Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2008; 26:47-54.

- [20] Souza ICL, Nascimento MF, Souza Neta RG, Santos JC, Costa LP, Cardoso JC et al. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Int J Med Sci* 2013; 5: 514-24.
- [21] Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg* 2013; 32: 41–52.
- [22] Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B et al. 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* 2013; 64:387-91.
- [23] Dungal P, Hartinger J, Chaudary S, Slezak P, Hofmann A, Hausner T et al. Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing. *Lasers Surg Med* 2014;46: 773-80.
- [24] Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014; 7: 301–11.
- [25] Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K (2014) The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int*. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/747584>
- [26] Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers Surg Med* 2015; 47: 210-5.
- [27] Masson-Meyers DS, Bumah VV, Enwemeka CS. A comparison of four methods for determining viability in human dermal fibroblasts irradiated with blue light. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2016; 79:15-22.
- [28] Opländer C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 2011; 103:118-25.

[29] Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol* 2014; 89: 616–23.7

[30] Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 614-21.

[31] Rocha CLJV, Rocha Júnior AM, Aarestrup BJV, Aarestrup FM. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in NOD mice cutaneous wound by low-level laser therapy. *J Vasc Bras* 2012; 11:175–81.

Tabela 1 Critérios utilizados para análise microscópica da área de reepitelização das feridas (Meireles et al., 2008)

Escore	Descrição
0	Ausente
1	Presente, cobrindo <50% da ferida
2	Presente, cobrindo >50% da ferida
3	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular
4	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular

Tabela 2 Descrição dos parâmetros utilizados para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas (Souza et al., 2013)

Escore da resposta inflamatória	Semiquantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Leve	
2	Moderada	Crônica (predominância de linfócitos e histiócitos)
3	Intensa	
4	Intensa	Subaguda (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos)
5	Intensa	Aguda (predominância de neutrófilos)

Tabela 3 Valores do Índice de Retração da Ferida (IRF) de ambos os grupos, em diferentes tempos de avaliação.

Grupo	IRF (%)	Mínimo - Máximo	<i>p</i>*
CTR 7	-40	-60 - -33	0,28
AZUL 7	-53	-122 - -24	
CTR 14	-17	-84 - 27	0,53
AZUL 14	-36	-70 - -6	
CTR 21	77	61 - 92	0,83
AZUL 21	81	-34 - 84	
CTR 28	96	83 - 100	0,57
AZUL 28	100	82 - 100	

* $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significativas

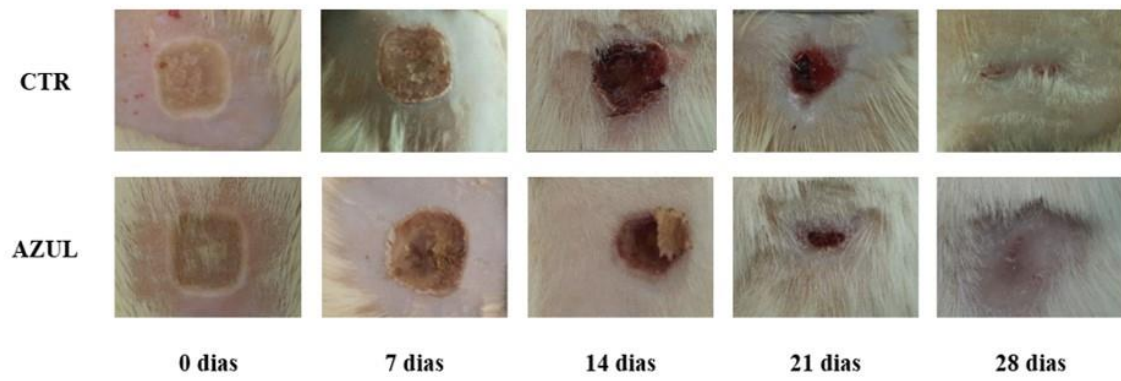


Fig. 1 Regressão clínica das feridas até 28 dias após a queimadura.

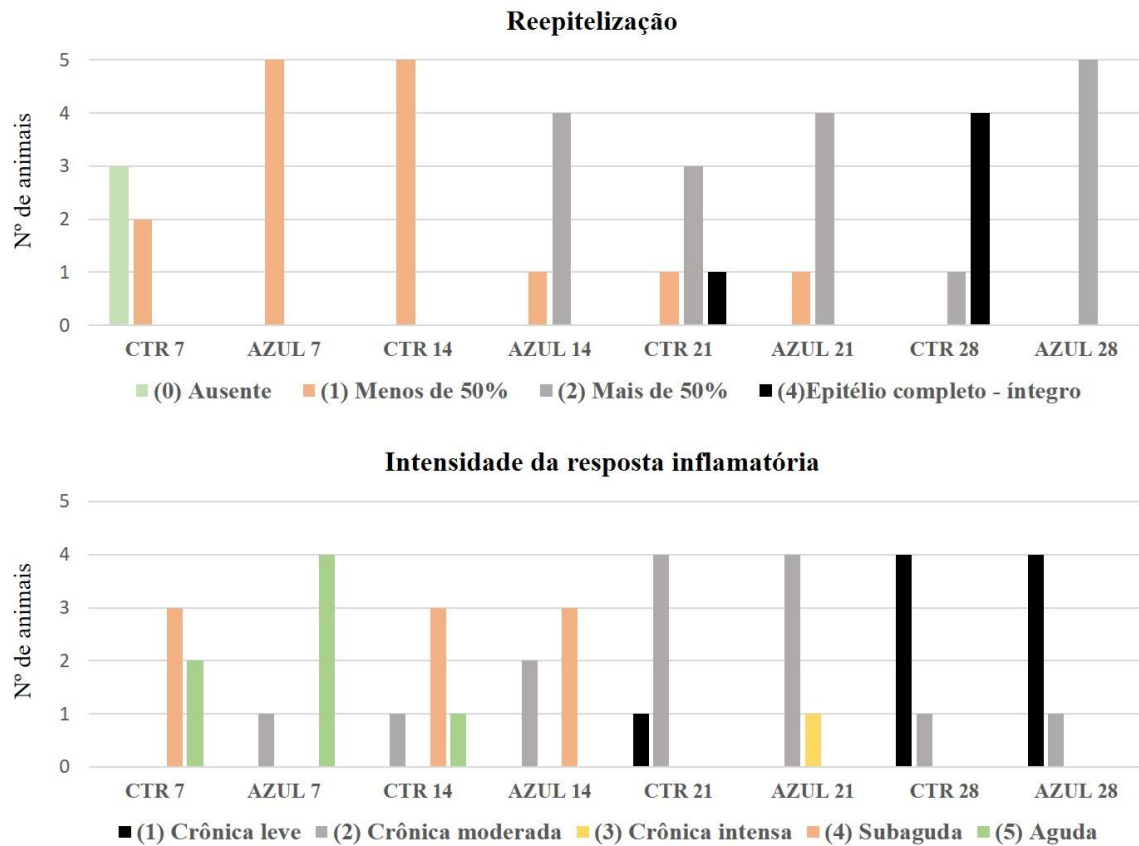


Fig. 2 Reepitelização e intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras nos dois grupos experimentais e em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). **a** Distribuição absoluta dos casos quanto aos escores de reepitelização das feridas. **b** Distribuição absoluta dos casos quanto a intensidade da resposta inflamatória nas queimaduras

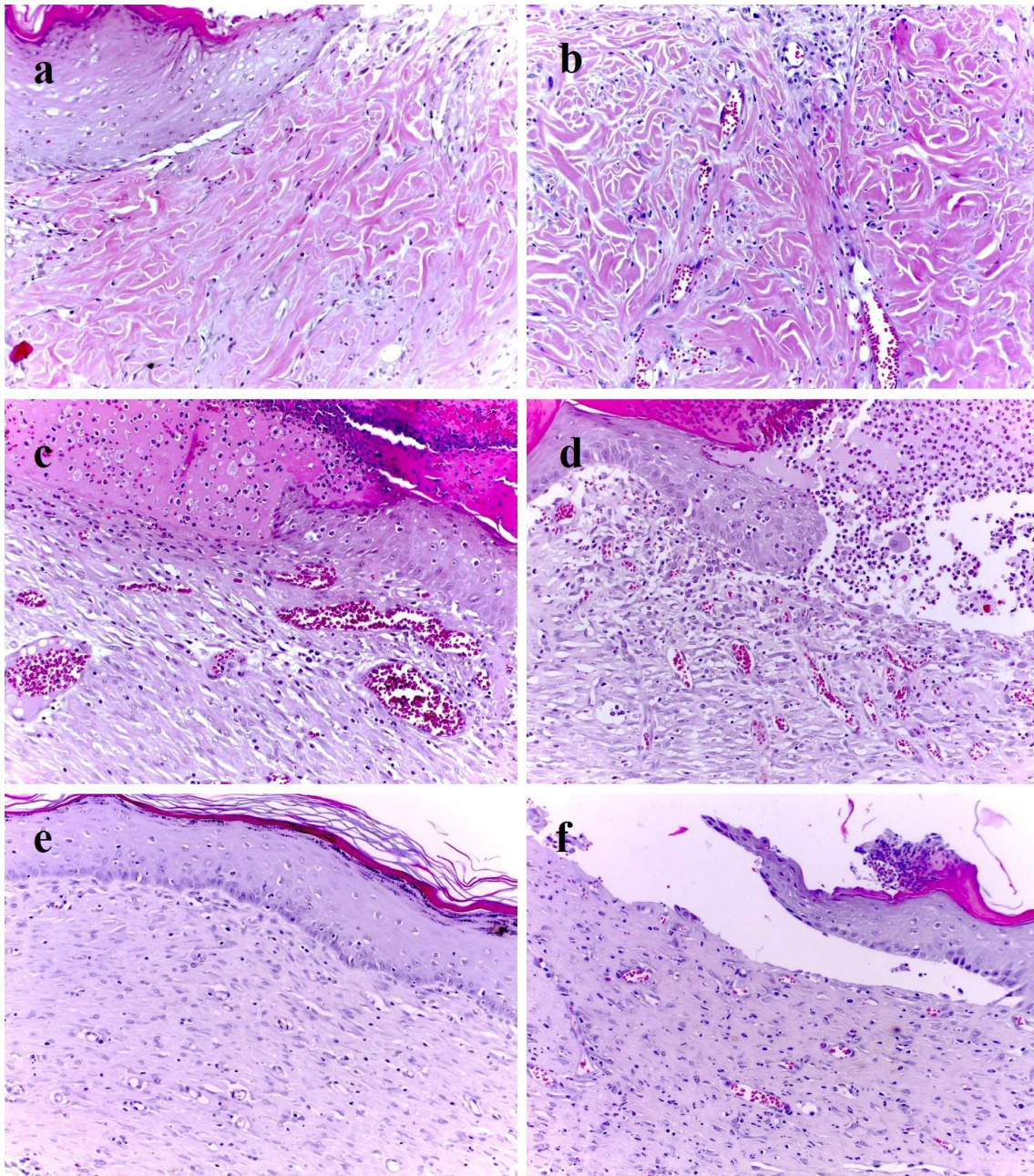


Fig. 3 Avaliação histológica das feridas em diferentes períodos. **a** Ferida do grupo CTR em 7 dias com presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e histiócitos) e início de reepitelização (HE; 200x) **b** Grupo AZUL em 7 dias, mostrando maior número de vasos sanguíneos e presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e histiócitos) (HE, x200). **c** Ferida em processo de reepitelização do grupo CTR, após 21 dias, com presença de crosta seroemática, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório (HE; x200). **d** Aspecto da ferida do AZUL, em 21 dias, com vasos sanguíneos dispostos no tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório de caráter crônico (HE; x200) **e** Reepitelização completa da ferida no CTR, após 28 dias da ferida, com pequenos vasos sanguíneos e pequeno número de células inflamatórias

no tecido conjuntivo (HE; x200). **f** Ausência de reepitelização completa no AZUL, em 28 dias, e vasos sanguíneos de diâmetros maiores no tecido conjuntivo (HE; x200).

Tabela 4 Comparação do consumo de ração por animal entre os grupos experimentais.

Grupo	Consumo de ração (gramas) /mediana	Mínimo - Máximo	<i>p</i>*
CTR 7	33,24	30,36 - 33,75	0,27
AZUL 7	37,79	31,64 – 40,38	
CTR 14	31,63	29,22 – 34,32	<0,01
AZUL 14	40,05	40,02 – 40,39	
CTR 21	36,56	31,05 – 40,00	0,01
AZUL 21	39,99	32,60 – 40,60	
CTR 28	32,51	28,03 – 35,66	<0,01
AZUL 28	40,10	40,00 – 40,60	

* $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significativas

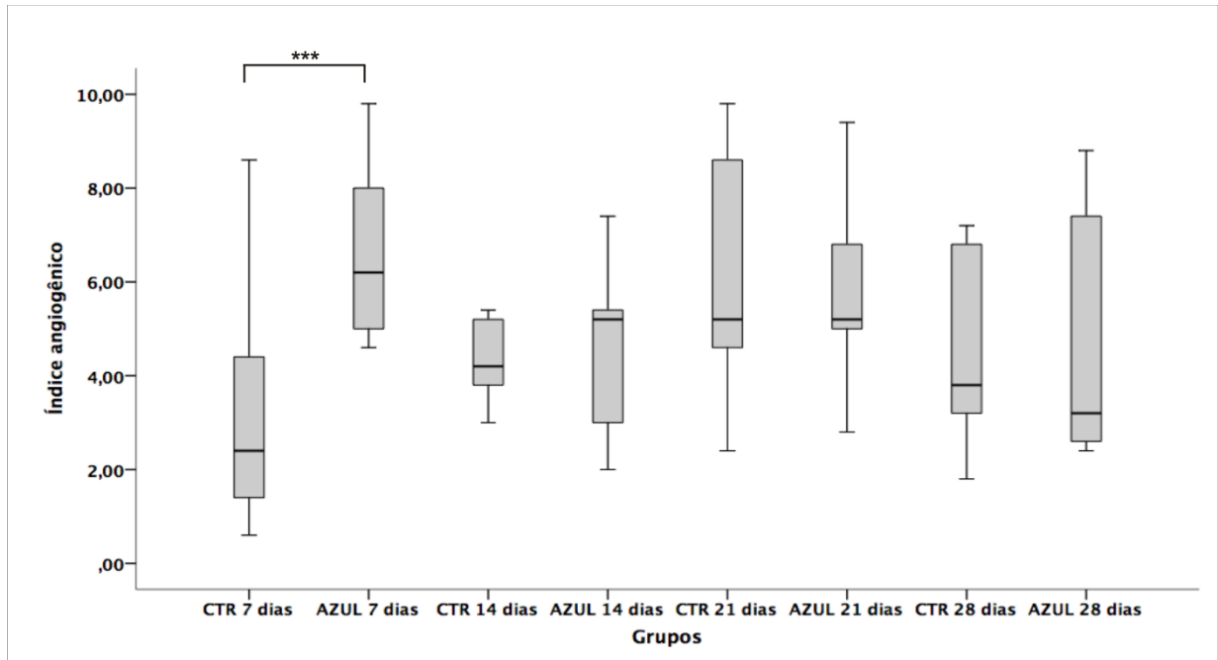


Fig. 4 Gráfico box-plot do índice angiogênico nas queimaduras de terceiro grau em pele de ambos os grupos em diferentes tempos avaliados. *** Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados deste estudo, pode-se sugerir que os LEDs vermelho e o azul, nas dosimetrias e protocolos utilizados, podem estimular em estágio inicial, atividades importantes do processo de cicatrização, como reepitelização e angiogênese, acompanhadas de possíveis efeitos analgésicos. Considerando as limitações das técnicas histoquímicas e análises utilizadas, sugere-se que futuros estudos sejam desenvolvidos, a fim de avaliar com maior minuciosidade as tendências reveladas nessa pesquisa e compreender melhor os efeitos fotobiomodulares dos LEDs na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele.

Convém destacar que com os resultados observados neste estudo, somados a carência de pesquisas sobre os efeitos de luzes não coerentes, principalmente do LED azul, no processo de fotobiomodulação em feridas de queimadura, o presente estudo abre um campo que merece destaque e futuras investigações.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMSKAYA, N. et al. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. **Injury**, v. 42, n.9, p. 917-921, 2011.
- AGNOL, M.A.D. et al. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med Sci**, v.24, n.6, p.909-916, 2009.
- AKHOONDINASAB, M.R. et al. Assessing effect of three herbal medicines in second and third degree burns in rats and comparison with silver sulfadiazine ointment. **Burns**, v. 41, n.1, p.125-131, 2015.
- AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg**, v.32, n.1, p.41-52, 2013.
- BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **Int J Bio Macromol**, v.102, p.380-383, 2017.
- BASSO, F. G. et al. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med Sci**, v.28, n.2, p.367-374, 2013.
- BEJENARU, C. et al. Effect of Scutellariae herba extracts in experimental model of skin burns: histological and immunohistochemical assessment. **Rom J Morphol Embryol**, v.57, n. 4, p.1285-1294, 2016.
- BRASSOLATTI, P. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Micros Res Tech**, v.79, p. 313-320, 2016.
- BUSUIOC, C.J. et al. Angiogenesis assessment in experimental third degree skin burns: a histological and immunohistochemical study. **Rom J Morphol Embryol**, v.52, n.3, p.887-895, 2011.
- CATÃO, M.H.C.V. et al. Effects of red laser, infrared, photodynamic therapy, and green LED on the healing process of third-degree burns: clinical and histological study in rats. **Lasers Med Sci**, v. 30, n.1, p.421-428, 2015.

CATÃO, M.H.C.V. et al. Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. **Burns**, v.42, n.2, p.392-396, 2016.

CHANG, M.H. et al. Light emitting diodes reliability review. **Microelectron Reliab**, v.52, n. 5, p.762-782, 2012.

CHAVES, M.E.A. et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An Bras Dermatol**, v.89, n.4, p.616-623, 2014.

CHIAROTTO, G.B. et al. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n.5, p. 1685-1693, 2014.

COLOMBO, F. et al. Effect of low-level laser therapy (λ 660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Braz Dent J**, v.24, n.4, p.308-312, 2013.

CURY, V. et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. **J Photochem Photobiol B**, v. 125, p.164–170, 2013.

DARBY, I.A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 7, p.301-311, 2014.

DAS, S. BAKER, A.B. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. **Front Bioeng Biotechnol**, v.4, n.82, p.1-20, 2016.

DUNGEL, P. et al. Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing. **Lasers Surg Med**, v.46, n. 10, p. 773-780, 2014.

FABRE, H.S.C. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. **J Phys Ther Sci**, v.27, n.6, p.1645-1648, 2015.

FANTINATI, M.S. et al. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir Bras**, v.31, n.7, p.463-471, 2016.

FEKRAZAD, R. et al. Effect of Laser Photostimulation on the healing of third-degree burn wounds in rats. **J Arch Mil Med**, v.2, n.3, e223156, 2014.

FEKRAZAD, R. et al. Evaluation of therapeutic laser influences on the healing of third-degree burns in rats according to different wavelengths. **J Cosmet Laser Ther**, v.6, p.1-5, 2017.

FIÓRIO, F.B. et al. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. **J Cosmet Laser Ther**, v.13, n.6, p.315-322, 2011.

FIÓRIO, F.B. et al. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers Med Sci**, v.29, n.1, p.313-319, 2014.

FREITAS, L.F; HAMBLIN, M.R. proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v.22, n.3, p.1-17, 2016.

FUSHIMI, T. et al. Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. **Wound Repair Regen**, v.20, n.2, p.226-235, 2012.

GAO, X; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci**, v. 16, n.1, p.1-16, 2009.

GARCIA, V.G. et al. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. **Lasers Med Sci**, v. 25, n.2, p. 221-228, 2010.

GOMES, M.T. et al. Experimental burns: Comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation. **Rev Assoc Med Bras**, v.63, n.1, p.29-34, 2017.

GUPTA, A. et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. **J Biophotonics**, v. 8, n. 6, p. 489–501, 2015.

HADIS, M. A. et al. Development and application of LED arrays for use in phototherapy research. **J Biophotonics**, p.1-12, 2017.

HUANG, C. et al. Light-emitting diode irradiation (640nm) regulates keratinocyte migration and cytoskeletal reorganization via hypoxia-inducible factor-1a. **Photomed Laser Surg**, v.34, n.8, p.313-320, 2016.

KIM, W.S; CALDERHEAD, R.G. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? **Laser Therapy**, v.20, n.3, p.205-215, 2011.

LEE, K.C; JOORY, K; MOIEMEN, N.S. History of burns: The past, present and the future. **Burn Trauma**, v. 2, n.4, p. 169-180, 2014.

LIM, W. et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. **Lasers Surg Med**, v.39, n.7, p. 614-621, 2007.

LINS, R.D.A.U. et al. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **An Bras Dermatol**, v.85, n.6, p. 849-855, 2010.

MAMALIS, A; GARCHA, M; JAGDEO, J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. **Lasers Surg Med**, v.47, n.2, p.210-215, 2015.

MASSON-MEYERS, D.S; BUMAH, V.V; ENWEMEKA, C.S. A comparison of four methods for determining viability in human dermal fibroblasts irradiated with blue light. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.79, p.15-22, 2016.

MEDEIROS, M.L. et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoeexpression in wound repair. **Lasers Med Sci**, v.32, n.1, p.35-43, 2017.

- MEIRELES, G.C.S. et al. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomed Laser Surg**, v.26, n.1, p.47-54, 2008.
- MESQUITA, R.L. et al. Effect of low-intensity therapeutic ultrasound on wound healing in rats subjected to third degree burns. **Acta Cir Bras**, v.31, n.1, p.36-43, 2016.
- MEYER, T.N; SILVA, A.L. A standard burn model using rats. **Acta Cir Bras**, v. 14. n.4, 1999.
- MORAES, J.M. et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers Med Sci**, v.28, n.4, p.1169-1176, 2013.
- NEVES, S.M.V. et al. Digital photogrammetry and histomorphometric assessment of the effect of non-coherent light (light-emitting diode) therapy ($\lambda 640 \pm 20$ nm) on the repair of third-degree burns in rats. **Lasers Med Sci**, v.29, n.1, p.2013-312, 2014.
- OLCZYK, P; MENCNER, L; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **Biomed Res Int**, v.2014, p. 1-8, 2014.
- OPEL, D.R. et al. Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience. **J Clin Aesthet Dermatol**, v.8, n.6, p.36-44, 2015.
- OPLÄNDER, C. et al. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. **J Photochem Photobiol B**, v.103, n.2, p.118-125, 2011.
- ORYAN, A; ALEMZADEH, E; MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **J Wound Care**, v.26, n. 1, p. 5-19, 2017.
- PAKYARI, M. et al. Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. **Adv Wound Care**, v.2, n.5, p.215-224, 2013.
- REINKE, J.M; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, v.49, p.35-43, 2012.

ROCHA, C.L.J.V. et al. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in NOD mice cutaneous wound by low-level laser therapy. **J Vasc Bras**, v. 11, n.3, p.175–181, 2012.

SILVEIRA, P.C.L. et al. Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on inflammatory response in burn wound healing. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p.1395-1404, 2016.

SOUSA, A.P.C. et al. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.4, p.547-552, 2010.

SOUSA, A.P.C. et al. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. **Lasers Med Sci**, v.28, n.3, p.981-987, 2013.

SOUZA, I.C.L. et al. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. **Int J Med Sci**, v.5, n.12, p.514-524, 2013.

SZYMANSKA, J. et al. 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**, v.64, n.3, p.387-391, 2013.

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

YADAV, A; GUPTA, A. Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 33, p.4-13, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Burns, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>>. Acesso em: 20 de mar. 2017.

APÊNDICES

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA



PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 6809092016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 09/09/2016

1. Pesquisador Responsável: **Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**
 Título do Projeto: **AÇÃO DA FOTOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM PELE: ANÁLISE CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.**
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em 09 / 09 / 2016.

Vigência do Projeto	01 de setembro de 2016 a 31 de junho de 2017
Espécie / linhagem	Rattus norvegicus - Wistar
Nº de animais	100
Peso / idade	200-250g / 60-90 dias de vida
Sexo	Machos
Origem	Biotério FCM

Parecer Final: APROVADO


Thárcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Agostinho de Figueiredo, 1981 - Itambé
 CEP: 58104-930 - Caruaru-PE, Brasil. Tel: 55 2101.8800
 www.ceued.br | facisa@ceued.br | fcm@ceued.br | ceua@ceued.br
 CNPJ: 02.708.023/0001-40

ANEXO B

Normas para submissão de trabalhos para o periódico *Lasers in Medical Science*.

Lasers in Medical Science

Editor-in-Chief: Keyvan **Nouri**

Lasers in Medical Science (LIMS) has established itself as the leading international journal in the rapidly expanding field of medical and dental applications of lasers and light. It provides a forum for the publication of papers on the technical, experimental, and clinical aspects of the use of medical lasers, including lasers in surgery, endoscopy, angioplasty, hyperthermia of tumors, and photodynamic therapy. In addition to medical laser applications, *LIMS* presents high-quality manuscripts on a wide range of dental topics, including aesthetic dentistry, endodontics, orthodontics, and prosthodontics.

The journal publishes articles on the medical and dental applications of novel laser technologies, light delivery systems, sensors to monitor laser effects, basic laser-tissue interactions, and the modeling of laser-tissue interactions. Beyond laser applications, *LIMS* features articles relating to the use of non-laser light-tissue interactions.

Instructions for Authors

Types of papers

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].
- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.
- Drugs
- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
- "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this

includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

- **Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.
- If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:
 - If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
 - If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent
- Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.
- The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.
- The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here.

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.
- English language tutorial
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ANEXO C

Normas para submissão de trabalhos para o periódico *Burns*.

Burns (OXFORD)

Editor

S.E. Wolf, Professor, Department of Surgery, UT Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas.

Burns aims to foster the exchange of information among all engaged in preventing and treating the effects of burns. The journal focuses on clinical, scientific and social aspects of these injuries and covers the prevention of the injury, the epidemiology of such injuries and all aspects of treatment including development of new techniques and technologies and verification of existing ones. Regular features include clinical and scientific papers, state of the art reviews and descriptions of burn-care in practice.

Types of paper:

- Original Paper
- Burn-care in practice
- Letter to the Editor
- Review Paper
- Editorial
- Personal Report
- Addendum
- Book Review
- Supplement

Ethics in publishing

Human and animal rights

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size:

Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or

other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint,

Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables must be placed on separate files and not embedded within the article text. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of

tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/burns>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.
Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Reference to a dataset: [dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also Samples of Formatted References).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Additional informations

Please submit your original manuscript and figures online, together with a covering letter which should be signed by the corresponding author on behalf of all authors, including:

- A statement that all authors have made substantial contributions. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.
- A statement that the manuscript, including related data, figures and tables has not been previously published and that the manuscript is not under consideration elsewhere.
- The names and contact addresses (including e-mail) of 3 potential reviewers that have not been involved in the design, performance and discussion of the data and are not a co-worker. You may also mention persons who you would prefer not to review your paper.

Each of the following sections should begin on a new page: title page; abstract; text; acknowledgements; references; tables; legends for illustrations. The title page should give the following information: title of the article; names, initials and appointment held by each author; name of the department or institution to which the work should be attributed and name and address of the author responsible for correspondence. The second page should carry an abstract of not more than 200 words. It should embody the purpose of the study or investigation, basic procedures (study material, observational and analytical methods), main findings (with specific data and their statistical significance) and the principal conclusions.