



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**THAMYRES MARIA SILVA SIMÕES**

**FOTOBIMODULAÇÃO DOS LEDs VERMELHO E VERDE NO PROCESSO DE  
REPARO EM QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU**

**CAMPINA GRANDE-PB**

**2018**

**THAMYRES MARIA SILVA SIMÕES**

**FOTOBIMODULAÇÃO DOS LEDs VERMELHO E VERDE NO PROCESSO DE  
REPARO EM QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU**

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: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

**CAMPINA GRANDE-PB**

**2018**

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 do trabalho.

S593f Simões, Thamyres Maria Silva.  
Fotobiomodulação dos leds vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau [manuscrito] / Thamyres Maria Silva Simões. - 2018.  
90 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."  
1. Fototerapia. 2. Queimaduras. 3. Cicatrização. 4. Miofibroblastos. I. Título

21. ed. CDD 617.11

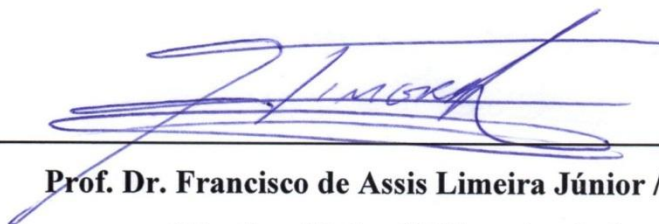
**THAMYRES MARIA SILVA SIMÕES**

**FOTOBIMODULAÇÃO DOS LEDs VERMELHO E VERDE NO PROCESSO DE  
REPARO EM QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU**

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: 12/07/2018**

**BANCA EXAMINADORA**



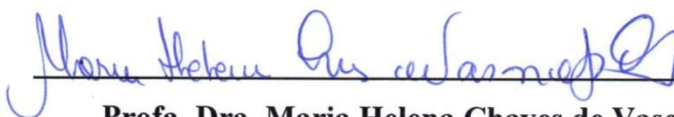
---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior / UFPB**  
**Membro titular (1º Examinador)**



---

**Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka / UEPB**  
**Membro titular (2º Examinador)**



---

**Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**  
**Membro titular (Orientadora)**

***“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé.”***

*2 Timóteo 2:3-4*

*Dedicatória*

Aos meus pais **José Marcos Santos Simões** e **Tânia Maria Silva Simões**, alicerce de amor incondicional, exemplos de fé, dedicação e honestidade.  
Todas as minhas vitórias serão sempre dedicadas a vocês!

# *Agradecimentos Especiais*



À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, pela efetiva contribuição na minha formação durante esses dois anos. Agradeço pelos seus conselhos, pelo carinho como sempre me trata e pelas inúmeras oportunidades a mim ofertadas. Obrigada por todo conhecimento compartilhado durante esta caminhada, a senhora tem a minha eterna admiração! Que Deus a ilumine!

Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, pela disponibilidade em compartilhar o seu conhecimento e pelas valiosas contribuições a esta pesquisa. Meu respeito e admiração pelo profissional e ser humano que o senhor é. Que Deus o abençoe!

À **Unifacisa**, por ter autorizado o desenvolvimento de parte fundamental desta pesquisa em suas instalações. Meus sinceros agradecimentos a esta instituição!

*Agradecimientos*

A **Deus**, pelas bênçãos derramadas e por me fazer instrumento da Tua vontade, pois sem o Teu amor e proteção não haveria razão de ser. Obrigado Senhor, sobretudo, por atender as minhas preces. “*Faça do Senhor a sua grande alegria e ele dará a você os desejos do seu coração*” (Salmo 37,4).

Ao meu pai **José Marcos Santos Simões**, pelos ensinamentos, educação e por não medir esforços para tornar o meu sonho realidade.

À minha mãe **Tânia Maria Silva Simões**, minha inspiração diária de amor e fé, minha gratidão e amor eterno por sempre tê-la ao meu lado ainda que distante!

Às minhas avós, **Socorro Felipe** e **Terezinha Simões**, e ao meu avô, **João Alexandre** (*in memoriam*), pelo colo, carinho e pelas orações constantes; presentes que o Pai nos enviou, a nossa maior herança!

Às minhas tias, **Telma Amaral** e **Tárcia Amaral**, e as minhas primas, **Thaynara**, **Naíra** e **Maria Júlia**, por acreditarem em mim e partilharem dos momentos mais importantes da minha vida.

À minha madrinha **Risomar Santos**, pelas palavras de carinho, orações e pela disponibilidade em sempre me ajudar.

Ao meu noivo, **Ivan Albuquerque**, obrigada pela confiança, paciência, por me amar e estar ao meu lado nos momentos de conquista. Amo muito você!

Aos amigos **Luana Balduino** e **Jamesson Andrade**, pela amizade e incentivo durante todo o mestrado, por me receberem com tanto carinho em Campina Grande e me acolherem no seu lar. Muito obrigada!

À **Família Lopes**, que me acolheu como filha durante estes dois anos. Obrigada pelo cuidado, carinho e por terem sido a minha família em Campina Grande. À vocês, a minha eterna gratidão!

À **Amanda Lucena** e **Mariana Vêras**, pelos conselhos e por me acolherem com tanto carinho durante estes dois anos, fazendo da sua casa, o meu lar!

Às amigas **Nelmara Sousa**, **Isolda Mirelle**, **Berthiene Medeiros** e **Bruna Siqueira**, pela alegria que é tê-las em minha vida e poder compartilhar cada conquista, mesmo que distante.

À **Universidade Federal de Campina Grande** e a todos os meus mestres, em especial, que me instigaram a conhecer o novo, sendo os responsáveis pela minha formação acadêmica e crescimento profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB** e a todos os Professores Permanentes e Colaboradores, por todos os ensinamentos e imensurável contribuição no meu processo de formação.

Ao **Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior** pela disponibilidade em participar da banca avaliadora desta dissertação e compartilhar os seus conhecimentos científicos em prol deste trabalho.

Aos amigos do grupo de pesquisa, **Ana Luzia Batista, José de Alencar, Maria das Graças Barbosa e Pettely Palmeira**, pela ajuda e apoio durante estes dois anos. Peço a Deus que ilumine o caminho de cada um!

Aos colegas de turma, **Adeilton Felix, Amanda Rufino, Elisa Diniz, Gabriela Neves, Giderlania Medeiros, Handerson Nunes, Ítalo Macedo, Jussara Barbosa, Larissa Chaves, Maria das Graças Barbosa, Robeci Macêdo e Waleska Ohana**, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas alegrias compartilhadas durante essa caminhada. Que Deus os abençoe!

A todos que fazem parte do Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, pelos conhecimentos compartilhados, apoio e ajuda durante toda a pesquisa, em especial as técnicas **Denise Núbia e Ana Luzia**; aos doutorandos **Emanuene Galdino, Fabianna Medeiros, Ingrid Morgana, Luana Samara e Luan Éverton**; aos mestrandos **Robeci Macêdo e Daniela**; ao **Prof. Dr. Tiago João** e a **Profa. Dra. Pollianna Muniz**.

Aos **funcionários e técnicos do Departamento de Odontologia da UEPB** e do **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB**, pelo auxílio e disponibilidade em sempre ajudar.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

A todos os que fizeram parte desta jornada, que acreditaram e torceram pelo meu sucesso, minha eterna gratidão.

*Resumo*

## RESUMO

As queimaduras são um problema global de saúde pública devido à sua frequência e também à sua gravidade. A intervenção precoce no processo cicatricial das queimaduras, especialmente as de terceiro grau, é fundamental para reduzir a gravidade das lesões, bem como as complicações e comprometimentos fisiológicos que delas provêm. Dentre as terapias complementares que vem sendo estudadas com o objetivo de acelerar o processo de cicatrização destas feridas, está o uso do *Light Emitting Diode* (LED). Este estudo teve como objetivo avaliar a fotobiomodulação do LED vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau, através de parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, massa entre 200 e 250 gramas, divididos aleatoriamente em 3 grupos: controle (CTR) (n=20), LED vermelho (VERM) (n=20) e LED verde (VERDE) (n=20), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). As aplicações do LED vermelho ( $\lambda=630\text{nm}\pm 10\text{nm}$ , 300 mW,  $9\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto, 30 segundos) e LED verde ( $\lambda=520\pm 30\text{nm}$ , 180 mW,  $60\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto, 30 segundos) foram realizadas diariamente, de forma pontual, em quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida (total:  $36\text{ J}/\text{cm}^2$  no VERM e  $240\text{ J}/\text{cm}^2$  no VERDE), com exceção do dia da eutanásia. Após a eutanásia dos animais, realizou-se a avaliação do índice de retração da ferida (IRF). Sob microscopia de luz, cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina foram avaliados quanto à superfície a ser reepitelizada e ao índice angiogênico (IA) (x400), através do programa *Image J* (versão 1.50i). Na análise imuno-histoquímica, o anticorpo anti- $\alpha$ -SMA foi utilizado para identificar, nas áreas mais superficiais do tecido conjuntivo, as maiores quantidades de miofibroblastos. O LED vermelho, aos 14 e 21 dias, induziu uma melhor reepitelização e IRF superior ao CTR ( $p=0,095$ ) e ao VERDE ( $p=0,001$ ), já o LED verde promoveu maior angiogênese em todos os períodos avaliados, e uma quantidade de miofibroblastos superior aos demais grupos aos 21 e 28 dias. Em conclusão, os LEDs vermelho e verde mostraram efeitos benéficos à cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

**Palavras-chaves:** Fototerapia; Queimaduras; Cicatrização; Miofibroblastos; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

*Abstract*

## ABSTRACT

Burns are a global public health problem because of their frequency and their severity. Early intervention in the cicatricial process of burns, especially those of third degree, is fundamental to reduce the severity of the lesions, as well as the complications and physiological compromises that come from them. Among the complementary therapies that have been studied with the objective of accelerating the healing process of these wounds, is the use of Light Emitting Diode (LED). This study aimed to evaluate the photobiomodulation of the red and green LEDs in the third degree burn repair process, through clinical, morphological and immunohistochemical parameters. Sixty male Wistar rats, aged 60-90 days, weighing between 200 and 250 grams, were randomly divided into three groups: control (CTR) (n=20), red LED (RED) (n=20) and GREEN LED (GREEN) (n=20), with subgroups (n=5) for each time of euthanasia (7, 14, 21 and 28 days). The applications of the red LED ( $\lambda=520\pm 30\text{nm}$ , 180 mW,  $60\text{ J/cm}^2$  per point, 30 seconds) were performed on a daily basis ( $\lambda=630\text{nm}\pm 10\text{nm}$ , 300mW,  $9\text{ J/cm}^2$  per point, 30 seconds) (total:  $36\text{ J/cm}^2$  in VERM and  $240\text{ J/cm}^2$  in GREEN), with the exception of the day of euthanasia. After the euthanasia of the animals, the evaluation of the wound retraction index (WRI) was performed. Under light microscopy, histological sections stained with hematoxylin and eosin were evaluated for the surface to be reepithelialized and the angiogenic index (AI) (x400), through the Image J program (version 1.50i). In the immunohistochemical analysis, the anti- $\alpha$ -SMA antibody was used to identify, in the most superficial areas of the connective tissue, the largest amounts of myofibroblasts. The red LED, at 14 and 21 days, induced better reepithelialization and WRI than CTR ( $p=0.095$ ) and GREEN ( $p=0.001$ ), the green LED promoted greater angiogenesis in all evaluated periods, and a myofibroblasts superior to the other groups at 21 and 28 days. In conclusion, the red and green LEDs showed beneficial effects on the healing of third degree burns.

**Keywords:** Phototherapy; Burns; Healing; Myofibroblasts; Low Intensity Light Therapy.



# *Lista de Abreviaturas e Siglas*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Do inglês <i>alpha-smooth muscle actin</i> , traduzido como alfa actina do músculo liso.
<b>AM</b>	Amazonas (estado brasileiro).
<b>ATP</b>	Do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i> , traduzido como Adenosina Trifosfato.
<b>°C</b>	Grau Celsius (unidade de temperatura).
<b>CA</b>	Califórnia (Estado norte-americano).
<b>CESED</b>	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento.
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais.
<b>CIAEP</b>	Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa.
<b>cm</b>	Centímetro (unidade de comprimento).
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado.
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetro cúbico.
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
<b>CTR</b>	Grupo Controle.
<b>DE</b>	Do alemão <i>Deutschland</i> , traduzido com Alemanha.
<b>EGF</b>	Do inglês <i>epidermal growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento epidérmico.
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas.
<b>FGF</b>	Do inglês <i>fibroblast growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento fibroblástico.
<b>°GL</b>	<i>Gay Lussac</i> (fração em volume)
<b>HGF</b>	Do inglês <i>hepatocysts growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento de hepatócitos.
<b>IA</b>	Índice Angiogênico.
<b>IL-1</b>	Do inglês <i>interleukyne-1</i> , traduzido como interleucina-1.
<b>IL-8</b>	Do inglês <i>interleukyne-8</i> , traduzido como interleucina-8.
<b>IRF</b>	Índice de Retração da Ferida.
<b>J</b>	Joule (unidade de energia).
<b>kg</b>	Kilograma (unidade básica de massa).
<b>KGF</b>	Do inglês <i>keratinocytes growth factor</i> , traduzido como traduzido como

fator de crescimento de queratinócitos.

<b>LASER</b>	Do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , traduzido como Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.
<b>LED</b>	Do inglês <i>Light Emitting Diode</i> , traduzido como Diodo Emissor de Luz.
<b>LTDA</b>	Limitada (termo jurídico).
<b>MEC</b>	Do inglês <i>extracellular matrix</i> , traduzido como matriz extracelular.
<b>µm</b>	Micrômetro (unidade de comprimento).
<b>mg</b>	Miligrama (unidade de massa).
<b>MG</b>	Minas Gerais (estado brasileiro).
<b>ml</b>	Mililitro (unidade de volume).
<b>mW</b>	Miliwatt (unidade de potência).
<b>MO</b>	Missouri (estado norte-americano).
<b>Nº</b>	Número.
<b>NJ</b>	Do inglês <i>New Jersey</i> , traduzido como Nova Jersey (estado norte-americano).
<b>NY</b>	Do inglês <i>New York</i> , traduzido como Nova Iorque (estado norte-americano).
<b>nm</b>	Nanômetro (unidade de comprimento).
<b>PB</b>	Paraíba (estado brasileiro).
<b>PDGF</b>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento derivado de plaquetas.
<b>SP</b>	São Paulo (estado brasileiro).
<b>TGF- α</b>	Do inglês <i>transforming growth factor alpha</i> , traduzido como fator de transformação do crescimento alfa.
<b>TGF- β</b>	Do inglês <i>transforming growth factor beta</i> , traduzido como fator de transformação do crescimento beta.
<b>TNF- α</b>	Do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i> , traduzido como fator de necrose tumoral alfa.
<b>TRIS</b>	Tris-hidroximetil-aminometano.
<b>UEPB</b>	Universidade Estadual da Paraíba.
<b>USA</b>	Do inglês <i>United States of America</i> , traduzido como Estados Unidos da América.

<b>VEGF</b>	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
<b>VERDE</b>	Grupo que recebeu fototerapia com LED verde.
<b>VERM</b>	Grupo que recebeu fototerapia com LED vermelho.
<b>1A4</b>	Refere-se ao clone do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA.

# *Lista de Ilustrações*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Desenho do estudo.....	33
<b>Quadro 1.</b> Variáveis dependentes analisadas no estudo.....	34
<b>Quadro 2.</b> Variáveis independentes analisadas no estudo.....	35
<b>Quadro 3.</b> Grupos de animais de acordo com os tratamentos realizados.....	36
<b>Quadro 4.</b> Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia.....	37
<b>Figura 2.</b> Mensuração da área da ferida através do programa gratuito <i>Image J</i> versão 1.50i ( <i>Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA</i> )...	38
<b>Quadro 5.</b> Critérios utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada (MEIRELES <i>et al.</i> , 2008).....	40
<b>Quadro 6.</b> Especificidade, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação do anticorpo primário utilizado na pesquisa.....	42
<b>Quadro 1.</b> Critérios utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada (MEIRELES <i>et al.</i> , 2008) (artigo).....	58
<b>Figura 1.</b> a Retração clínica das feridas até 28 dias após a queimadura. b Gráfico box plot ilustrando a retração das feridas nos grupos experimentais e nos diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias) (artigo).....	59
<b>Figura 2.</b> a Ferida do grupo VERDE aos 7 dias exibindo início de reepitelização e numerosos vasos sanguíneos de pequeno calibre no tecido conjuntivo subjacente (Hematoxilina e eosina, 100x). b Ferida em processo de reepitelização no grupo VERM aos 14 dias. Destaque para a reação de granulação em áreas superficiais do tecido conjuntivo e para a maior deposição de colágeno em áreas mais profundas (Hematoxilina e eosina, 100x). c Reepitelização incompleta da ferida e tecido conjuntivo exibindo diversos vasos sanguíneos ingurgitados no grupo VERDE aos 21 dias (Hematoxilina e eosina, 100x). d Reepitelização completa no grupo CTR aos 28 dias, com ocasionais vasos sanguíneos de pequeno calibre e discreto infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo subjacente (Hematoxilina e eosina, 100x). e	

Miofibroblastos em região superficial do tecido conjuntivo, dispostos paralelamente à superfície epitelial, em ferida do grupo CTR aos 14 dias (Reveal, 200x). f Numerosos miofibroblastos em ferida do grupo VERDE aos 21 dias (Reveal, 200x) (artigo)..... 60

**Figura 3.** Distribuição absoluta dos grupos experimentais quanto aos escores utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada das feridas em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias) (artigo)..... 61

**Figura 4.** Gráfico box plot para avaliação do índice angiogênico em queimaduras de terceiro grau de acordo com os grupos experimentais e o tempo de eutanásia (artigo)..... 62

**Figura 5.** Gráfico box plot para avaliação da diferenciação miofibroblástica em queimaduras de terceiro grau de acordo com os grupos experimentais e o tempo de eutanásia (artigo)..... 63

# *Sumário*



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> ..... 25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> ..... 31
2.1	OBJETIVO GERAL..... 31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 31
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> ..... 33
3.1	DESENHO DO ESTUDO..... 33
3.2	ASPECTOS ÉTICOS..... 33
3.3	AMOSTRA..... 34
3.4	VARIÁVEIS..... 34
3.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS..... 36
3.6	ANESTESIA E TRICOTOMIA..... 36
3.7	INDUÇÃO DA QUEIMADURA..... 36
3.8	CARACTERÍSTICAS DOS LEDs..... 37
3.9	FOTOTERAPIA..... 37
3.10	EUTANÁSIA..... 38
3.11	ÍNDICE DE RETRAÇÃO DA FERIDA (IRF)..... 38
3.12	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO..... 39
3.13	ANÁLISE MORFOLÓGICA..... 39
3.14	PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO..... 40
3.15	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA..... 42
3.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 42
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> ..... 44
4.1	APRESENTAÇÃO..... 44
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 45
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... 65
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 67
	<b>ANEXOS</b> ..... 73
	<b>APÊNDICES</b> ..... 87

# *Considerações Iniciais*

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAS

As queimaduras são um problema global de saúde pública e representam cerca de 180 mil mortes por ano, ocorrendo em sua maioria em países de baixa e média renda, principalmente na casa e local de trabalho da vítima (WHO, 2016). Segundo dados do Ministério da Saúde, anualmente, ocorrem em torno de 1 milhão de acidentes com queimaduras no Brasil, correspondendo a 38% das principais doenças tratadas no sistema de saúde do país (MELLO *et al.*, 2007; CRUZ; CORDOVIL; BATISTA, 2012; BRASIL, 2017).

As queimaduras podem ser definidas como lesões traumáticas, causadas principalmente pelo calor, radiação, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos, estando a sua gravidade diretamente relacionada com a profundidade da lesão gerada, podendo ser classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau (WHO, 2016; MARTIN; FALDER, 2017).

As queimaduras de primeiro grau são mais superficiais e comprometem apenas a camada epidérmica. Não produzem bolhas, causam dor variável e eritema, resolvendo-se em poucos dias. As de segundo grau podem ser superficiais ou profundas. As superficiais cicatrizam entre duas e três semanas, acometem a epiderme e a camada mais superficial da derme. Os sintomas são semelhantes aos das queimaduras de primeiro grau, incluindo o aparecimento de bolhas e uma aparência úmida da lesão. As queimaduras de segundo grau profundas acometem toda a espessura da derme e como há risco de destruição das terminações nervosas da pele, podem ser menos dolorosas quando comparadas as queimaduras mais superficiais. O tempo necessário para cicatrização pode ser superior a três semanas e costuma deixar cicatrizes (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017).

As queimaduras de terceiro grau são definidas como lesões de alta complexidade, por sua extensão, que envolvem todas as estruturas da pele e seus anexos, podendo atingir músculos e estruturas ósseas. São de aspecto esbranquiçado e rígido, indolores, devido aos danos causados as terminações nervosas do local, e eventualmente podem cicatrizar com retração das bordas, deixando deformidades ou cicatrizes (BUSUIOC *et al.*, 2011; CATÃO *et al.*, 2015; BRASSOLATTI *et al.*, 2016).

As queimaduras revelam uma resposta imune celular característica que a difere de outros tipos de feridas como aquelas decorrentes de incisões e punção experimental, consequentemente, os processos de reparo e cicatrização de tecido provavelmente têm características peculiares entre si (MELO *et al.*, 2018).

As principais características fisiológicas desse processo de reparo são o aumento da permeabilidade vascular local, edema e exsudação significativa, regulado por mecanismos

celulares, humorais e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual. Os mecanismos da cicatrização em sequência ordenada de eventos foram descritos por Carrel (1910) e reclassificados por Clark (2005), posteriormente, em três fases interdependentes e sobrepostas dinamicamente no tempo: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (CAMPOS; BROGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; BARDAA *et al.*, 2016).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão no tecido e é caracterizada pela vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e pela migração de células para o local da ferida. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata de coagulação, liberando fatores de crescimento, como o fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanos, que atraem neutrófilos à região (CAMPOS; BROGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Os neutrófilos possuem funções antimicrobianas inatas, além de liberarem proteases, para eliminação de tecido necrótico, e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Após dois ou três dias na área da ferida, os neutrófilos são eliminados no processo de apoptose e substituídos por monócitos, que ao entrarem na área da ferida transformam-se em macrófagos. Além de suas funções imunológicas, como células apresentadoras de antígenos e fagócitos durante a reparação da ferida, os macrófagos são as principais fontes de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação fibroblástica e a biossíntese de colágeno (CAMPOS; BROGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A fase proliferativa tem início após as principais respostas inflamatórias à lesão. É nessa etapa onde se observa o início da reepitelização pela migração de ceratinócitos das bordas e anexos remanescentes, estimulados pelo fator de crescimento de transformação- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), seguida pela diferenciação do neoepitélio e restauração da membrana basal. A angiogênese é primariamente promovida por citocinas secretadas por macrófagos, como TGF- $\beta$ , FGF e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores modulam a proliferação de células endoteliais e contribuem para a proliferação de fibroblastos (REINKE; SORG, 2012; PAKYARI *et al.*, 2013; DARBY *et al.*, 2014).

As células-chave do processo de contração da ferida são os fibroblastos. Estas células passam por mudanças fenotípicas acentuadas, de células imaturas, migratórias e replicativas no início do processo, para células ativamente engajadas na síntese proteica, denominados miofibroblastos. Os miofibroblastos são caracterizados pela expressão da  $\alpha$ -actina de músculo

liso ( $\alpha$ -SMA) em fardos de microfilamentos ou fibras de estresse e desempenham um papel importante na contração e maturação do tecido de granulação (GABBIANI, 2003; DARBY *et al.*, 2014; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A remodelação tecidual é a fase final da cicatrização e continua por 6 a 24 meses após a lesão inicial. Este processo envolve a regressão vascular e remodelação do tecido de granulação, além da formação de novos componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina e fibronectina, promovidos em parte por PDGF e TGF- $\beta$ 1. Progressivamente, o colágeno tipo III, produzido na fase proliferativa, é substituído pelo colágeno tipo I, recém-sintetizado. Posteriormente, os miofibroblastos promovem a contração da ferida devido as suas ligações ao colágeno e auxiliam na diminuição da superfície da cicatriz em desenvolvimento. Além disso, os processos angiogênicos diminuem, o fluxo sanguíneo da ferida diminui e a atividade metabólica da ferida aguda desacelera e finalmente cessa (REINKE; SORG, 2012; PAKYARI *et al.*, 2013).

O uso de terapias que promovam o reparo do tecido queimado de forma rápida, eficaz e que reduzam os custos do tratamento, representa um grande benefício para a qualidade de vida do paciente, sendo objetivo de várias pesquisas científicas (OLCZYK *et al.*, 2014; AKHOONDINASAB *et al.*, 2015; CATÃO *et al.*, 2015; BRASSOLATTI *et al.*, 2016; CATÃO *et al.*, 2016; FANTINATI *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2017).

Entre as terapias utilizadas, destaca-se a fototerapia com uso do *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (LASER) (COLOMBO *et al.*, 2013; CHIAROTTO *et al.*, 2014; BRASSOLATTI *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2017) e *Light Emitting Diode* (LED) (FUSHIMI *et al.*, 2012; CATÃO *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2018).

A fototerapia envolve a aplicação de uma fonte de luz de baixa potência, não térmica e não ablativa, para estimular ou inibir diretamente processos celulares e biológicos. A fototerapia melhora a produção de adenosina trifosfato (ATP), essencial para o metabolismo energético celular, aumenta a síntese proteica e estimula a microcirculação por melhora da contribuição nutricional, o que, associado ao aumento da atividade mitótica, resulta em multiplicação celular facilitada e na formação de novos vasos a partir de outros já existentes (DALL AGNOL *et al.*, 2009; CHAVES *et al.*, 2014).

Após a sua introdução, em 1967, por Endre Mester, o uso da luz como modalidade terapêutica no tratamento de condições fisiopatológicas, ganhou atenção dos pesquisadores em todo o mundo. Desde então, a fotobiomodulação, anteriormente denominada “Terapia com luz de baixa intensidade”, uma das categorias da fototerapia, tem avançado constantemente e

é amplamente utilizada na cicatrização de feridas, lesões musculares e nervosas, na redução da inflamação e dor, e na restauração de função (GUPTA *et al.*, 2013; ANDERS; LAZALAME; ARANY, 2015; YADAV; GUPTA, 2017).

Os mecanismos biológicos que suportam essas ações nos tecidos ainda não estão claramente elucidados, mas sabe-se que a luz em baixa intensidade pode interagir com as células, levando a mudanças nos níveis molecular, celular e tecidual. Essa interação, no entanto, dependerá das características e parâmetros dos dispositivos de luz, comprimento de onda e dose, e também das propriedades ópticas do tecido (CHAVES *et al.*, 2014; FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Os LEDs são dispositivos compostos por semicondutores, ligados entre si, com propriedade de transformar energia elétrica em uma luz monocromática, com comprimentos de onda que variam do espectro ultravioleta ao infravermelho. Os LEDs oferecem uma alternativa eficaz ao uso de fontes de luz (TORRES *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2012; AVCI *et al.*, 2013; CATÃO *et al.*, 2015).

A luz LED não apresenta as características de colimação, coerência espacial e temporal, o que a tornaria menos eficiente ou incapaz de promover efeitos terapêuticos, quando comparada ao LASER. Entretanto, a resposta celular à terapia com luz não está associada a propriedades específicas da luz LASER, já que esta é perdida durante a interação da luz com o tecido biológico (CHAVES *et al.*, 2014).

A fototerapia LED pode ser utilizada em tratamentos convencionais ou como terapia complementar e assim como o LASER, apresenta efeitos positivos na angiogênese e na vascularização do tecido (SOUSA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2018).

Estudos que avaliaram a eficácia da fotobiomodulação com LED vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau *in vivo*, observaram uma diminuição significativa no número de células inflamatórias nos grupos que receberam fototerapia (FIÓRIO *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2016), 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 (*Pubmed Database, Scopus, Web of Science, LILACS* – acesso em 08/08/2018) avaliaram os efeitos *in vivo* do LED verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em pele (CATÃO *et al.*, 2015; CATÃO *et al.*, 2016), sendo observado aceleração no processo de cicatrização deste tipo de lesão, devido ao estímulo a produção de fibroblastos, ao seu efeito anti-inflamatório e maturação de fibras colágenas nos períodos 3, 7, 11 e 21 dias.

A exposição aos LEDs vermelho e verde induz a produção de citocinas pelos fibroblastos, fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento de hepatócito (HGF), enquanto a leptina, interleucina-8 (IL-8) e VEGF são aumentadas apenas pelo LED verde. Coletivamente, esses fatores desencadeiam a fibrose celular para acelerar o reparotecdual (FUSHIMI *et al.*, 2012).

Fushimi *et al.* (2012) ao comparar a ação do LED verde ( $\lambda=518$  nm) e do LED vermelho ( $\lambda=638$  nm) em feridas cutâneas induzidas por punch, relataram uma redução significativa na áreas destas feridas 7 dias após a exposição à fototerapia com LED verde e reepitelização completa da área da ferida nos grupos tratados com LED verde e vermelho no 11º dia, enquanto a ferida do grupo controle apresentou-se reepitelizada no 13º dia. O estudo de Sousa *et al.* (2013) encontrou resultados semelhantes, sugerindo que a fototerapia com LED verde, assim como a utilizando o LED vermelho, pode ser uma importante estratégia terapêutica para a cicatrização de feridas.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a fotobiomodulação dos LEDs vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau, através de parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos.

*Objetivos*



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a fotobiomodulação dos LEDs vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau, através de parâmetros clínicos, morfológicos e imunohistoquímicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

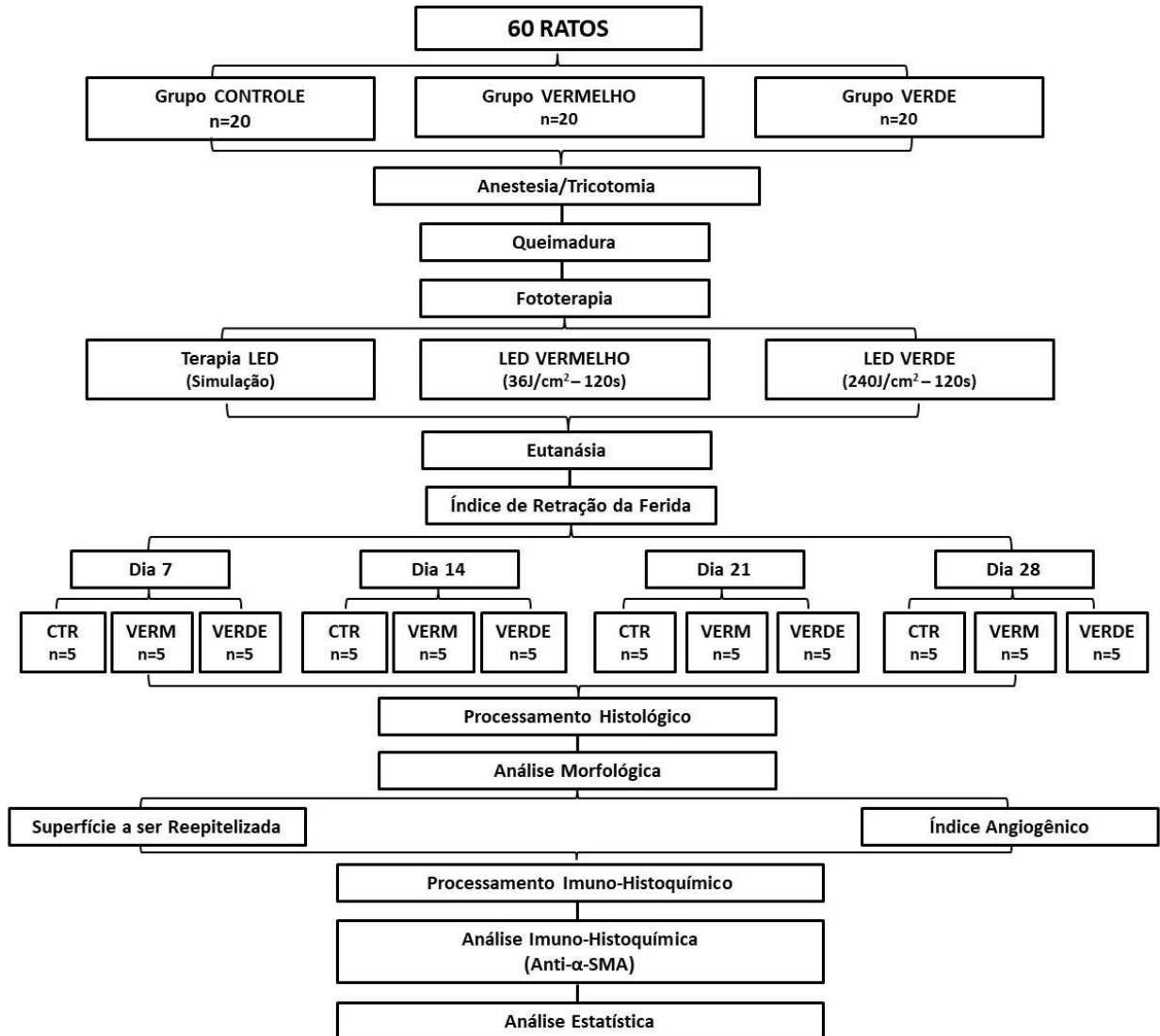
- Avaliar o grau de retração da ferida entre os grupos em diferentes tempos de reparo;
- Determinar os índices percentuais de reepitelização nos grupos;
- Mensurar e comparar o índice angiogênico entre os grupos experimentais;
- Quantificar os miofibroblastos, por meio da imunorreatividade ao anti- $\alpha$ -SMA, e avaliar possíveis diferenças entre os grupos em diferentes tempos do processo de reparo.

*Materiais e Métodos*

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de caráter experimental *in vivo*.



**Figura 1.** Desenho do estudo.

#### 3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão 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*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, massa entre 200 e 250 gramas provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) na cidade de Campina Grande-PB.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com o máximo de cinco animais por caixa, forradas com cama de maravalha e com tampa metálica por onde receberam água *ad libitum* por sucção em frasco de vidro e ração padronizada (*Presence*<sup>®</sup> Ratos e Camundongos, Linha Laboratório, Paulínia, SP, Brasil). A temperatura do biotério foi padronizada em  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro). Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer manifestação de doença local ou sistêmica.

### 3.4 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes, analisadas neste estudo, foram listadas nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

**Quadro 1.** Variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NATUREZA	CATEGORIA
<b>Índice de Retração da Ferida</b>	Percentual de retração da área da ferida	Quantitativa	-

<b>Superfície a ser Reepitelizada</b>	Percentual da superfície da ferida ser reepitelizada	Qualitativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Ausente</li> <li>. Menos de 50% da ferida</li> <li>. Mais de 50% da ferida</li> <li>. Epitélio completo, espessura irregular</li> <li>. Epitélio completo, espessura regular</li> </ul>
<b>Índice Angiogênico</b>	Número médio de vasos em dez campos ( $\times 400$ ) de maior vascularização por espécime.	Quantitativa	-
<b>Miofibroblastos</b>	Número médio de miofibroblastos em dez campos ( $\times 400$ ) de maior imunorreatividade ao anticorpo anti- $\alpha$ -SMA.	Quantitativa	-

**Quadro 2.** Variáveis independentes analisadas no estudo.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>NATUREZA</b>	<b>CATEGORIA</b>
<b>Tratamentos</b>	Tratamentos utilizados no estudo	Qualitativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>.Controle</li> <li>.LED verde</li> <li>.LED vermelho</li> </ul>
<b>Tempos de Eutanásia</b>	Tempos em que os animais foram submetidos à eutanásia	Qualitativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>.07 dias</li> <li>.14 dias</li> <li>.21 dias</li> <li>.28 dias</li> </ul>

### 3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n= 20), com subgrupos de 5 animais para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias) (QUADRO 3).

**Quadro 3.** Grupos de animais de acordo com os tratamentos realizados.

GRUPOS	TRATAMENTO	N	T (DIAS)	SUBGRUPO (N)
CTR	Controle	20	7, 14, 21, 28	5
VERM	LED Vermelho	20	7, 14, 21, 28	5
VERDE	LED Verde	20	7, 14, 21, 28	5

### 3.6 ANESTESIA E TRICOTOMIA

Os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (*Cetamin*<sup>®</sup>, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (*Dopaser*<sup>®</sup>, Hertape, Juatuba, MG, Brasil) aplicada na região intraperitoneal com uma seringa e agulha estéreis de 1ml para insulina (SR<sup>®</sup>, Manaus, AM, Brasil). Constatado o plano anestésico profundo, os animais foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a tricotomia da região dorsal, utilizando lâmina de barbear (*LORD*<sup>®</sup> Co., Alexandria, Egito), porta-agulha e digluconato de clorexidina 0,5% (*Riohex*<sup>®</sup> 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

### 3.7 INDUÇÃO DA QUEIMADURA

Previamente à queimadura, realizou-se antissepsia tópica do dorso do animal utilizando gaze estéril embebida em solução de digluconato de clorexidina 0,5% (*Riohex*<sup>®</sup> 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Posteriormente, A queimadura foi realizada no dorso dos animais com um instrumento de ferro, de ponta ativa chata e plana com 1cm<sup>3</sup>, previamente confeccionado. O instrumento foi aquecido 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 a metodologia descrita por Meyer e Silva (1999) e modificada por Catão *et al.* (2015).

As queimaduras foram confirmadas por meio da análise histológica das lâminas coradas em hematoxilina e eosina, onde foi observada a destruição total da epiderme e derme, e degradação do tecido muscular, característico das queimaduras de terceiro grau.

### 3.8 CARACTERÍSTICAS DOS LEDs

Foram utilizados neste estudo o LED vermelho de  $\lambda=630\text{nm}\pm 10\text{nm}$  (*LED Bios Therapy II*<sup>®</sup>, Bios Indústria e Comércio, São José dos Campos, SP, Brasil) e o LED verde de  $\lambda=520\pm 30\text{nm}$  (*D-Light Green*<sup>®</sup>, Kordontec, São Paulo, SP, Brasil) (QUADRO 4).

**Quadro 4.** Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia.

PARÂMETROS	<i>BIOS THERAPY II</i> <sup>®</sup>	<i>D-LIGHT GREEN</i> <sup>®</sup>
Potência	300 mW	180 mW
Comprimento de onda	$630 \pm 10\text{nm}$	$520 \pm 30\text{ nm}$
Diâmetro do feixe	1,3 cm	1,3 cm
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo

### 3.9 FOTOTERAPIA

Aplicação do LED foi realizada por um único operador devidamente calibrado e seguiu as normas de segurança necessárias, ressaltando a utilização dos óculos de segurança para o operador e demais assistentes e utilização de um filme plástico entre a superfície da ferida e do equipamento, evitando assim possíveis contaminações.

As aplicações foram iniciadas imediatamente após as queimaduras, de forma pontual, em quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida e se repetiram diariamente, com exceção dos dias de eutanásia.

As características de cada tipo de tratamento utilizado são descritas abaixo:

- CTR: Os animais receberam a simulação do tratamento.
- VERM: Em cada ponto foram depositados  $9\text{ J/cm}^2$ , totalizando  $36\text{ J/cm}^2$ , e tempo de exposição de 120 segundos por sessão.
- VERDE: Em cada ponto foram depositados  $60\text{ J/cm}^2$ , totalizando  $240\text{ J/cm}^2$ , e tempo de exposição de 120 segundos por sessão.

### 3.10 EUTANÁSIA

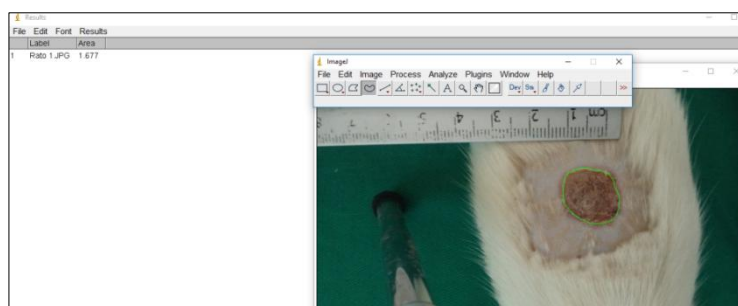
Após o período experimental, os animais seguiram para eutanásia, sendo alojados em caixas hermeticamente fechadas, com algodão embebido com halotano (*Tanohalo*<sup>®</sup> 1ml/ml, *Cristália*, Itapira, SP, Brasil). A morte foi constatada por dois avaliadores, previamente calibrados, por meio da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos dos animais. Realizada a eutanásia, os animais foram recolhidos por uma empresa especializada e encaminhados para incineração.

### 3.11 ÍNDICE DE RETRAÇÃO DA FERIDA (IRF)

Para a avaliação da retração da ferida, as lesões foram inicialmente fotografadas com câmera fotográfica digital *Sony SteadyShot (DSC-W710 16.1 MP) Zoom 5x*, a uma distância padronizada de 15 cm do dorso do animal, com auxílio de um tripé. Foi utilizada uma régua próxima ao animal, sem contato direto com a região queimada, como escala para a mensuração da área da ferida. As imagens foram transferidas para um computador e analisadas no programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). 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*. Em seguida, a ferida foi detalhadamente contornada por um único avaliador, sem conhecimento prévio do grupo analisado, através da ferramenta *Freehand selections*. Feito isso, o programa calculou a área de interesse, por meio da ferramenta *Measure*, na guia *Analyze* (FIGURA 2).

O IRF foi calculado pela equação:

$$\text{IRF (\%)} = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}}{\text{área inicial}} \times 100$$



**Figura 2.** Mensuração da área da ferida através do programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*).



Em sequência, foi estabelecida a média por grupo de tratamento e os dados obtidos, anotados em fichas apropriadas para esta avaliação (APÊNDICE A).

### 3.12 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Constatada a morte do animal, a ferida foi excisada com bisturi e tesouras estéreis, respeitando-se uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm. O espécime foi acondicionado submerso em recipiente plástico contendo formol a 10%, por período mínimo de 24 horas. Os recipientes foram identificados com informações específicas de cada animal: grupo e subgrupo experimental, número do animal e data da eutanásia.

Os espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina, de acordo com o protocolo utilizado no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e descrito a seguir:

- ✓ 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*<sup>®</sup> (*Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA*).

### 3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Sob microscopia de luz (*ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), um único avaliador, previamente treinado, realizou a avaliação da superfície a ser

reepitelizada das feridas segundo os critérios utilizados por Meireles *et al.* (2008) (QUADRO 5). Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em ficha específica (APÊNDICE B).

Para avaliação do índice angiogênico, foi adaptada a metodologia proposta por Medeiros *et al.* (2013). Foram realizadas fotomicrografias (*ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*) em dez campos ( $\times 400$ ) de maior vascularização por espécime, localizadas nas áreas mais superficiais do tecido conjuntivo. As imagens obtidas foram transferidas para um computador e os vasos sanguíneos contabilizados com auxílio do programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*).

Por fim, a média dos vasos sanguíneos, para cada animal, foi anotada em ficha específica (APÊNDICE C).

**Quadro 5.** Critérios utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada (MEIRELES *et al.*, 2008).

ESCORES	DESCRIÇÃO
<b>Reepitelização</b>	Ausente (0)
	Presente, cobrindo <50% da ferida (1)
	Presente, cobrindo >50% da ferida (2)
	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular (3)
	Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular (4)

### 3.14 PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Os espécimes, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes de 3 $\mu$ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (*3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA*). Em seguida, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal<sup>TM</sup>, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA*), utilizando o anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -SMA (QUADRO 6). Como controle positivo interno, foram utilizados os vasos sanguíneos, por meio da imunorreatividade das células musculares lisas que os circundam. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo descrito abaixo:

- ✓ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- ✓ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ✓ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ✓ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Incubação dos cortes com anticorpo primário (anti- $\alpha$ -SMA) em solução diluente (*Antibody diluent, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (60 minutos);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímeros de dextrano (*Complement, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ✓ Duas passagens rápidas em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL pH 7,4;
- ✓ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugate, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB + Substrate System, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*) (10 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ✓ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- ✓ Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ✓ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ✓ Montagem em resina *Permout*<sup>®</sup> (*Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, US*).

**Quadro 6.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação do anticorpo primário utilizado na pesquisa.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
$\alpha$ -SMA	1A4	Abcam	1:15000	Sem recuperação	60 minutos

### 3.15 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após o processamento histológico e tratamento imuno-histoquímico, os espécimes foram avaliados sob microscopia de luz (*JCC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), a fim de identificar as áreas mais superficiais do tecido conjuntivo com maiores quantidades de miofibroblastos, caracterizados pela positividade citoplasmática ao anticorpo anti- $\alpha$ -SMA.

Para isso, foram realizadas fotomicrografias em dez campos (x400) e as células imunorreativas contabilizadas com auxílio do programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). Por fim, a média de células imunorreativas, para cada animal, foi anotada em fichas específicas (APÊNDICE D).

### 3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imuno-histoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics 20.0 program (IBM Corp., Armonk, NY, USA)*, no qual foram realizadas as análises estatísticas.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O IRF, IA e os dados referentes à quantidade de miofibroblastos, foram analisados através do teste de Mann-Whitney. Os dados referentes à superfície a ser reepitelizada foram analisados descritivamente. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

*Artigo*

## 4 ARTIGO

### 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, um artigo será apresentado nesta dissertação: “Fotobiomodulação dos LEDs vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Lasers in Medical Science* (ISSN: 0268-8921, Fator de impacto: 1.949, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

## 4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

### **Fotobiomodulação dos LEDs vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau**

*Running title: Fotobiomodulação no reparo tecidual em queimaduras*

Thamyres Maria Silva Simões<sup>1</sup>, Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>1</sup>, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Postgraduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil.*

#### ***Corresponding autor***

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, PhD

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúna, 531 – Bairro Universitário- Campina Grande - PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/Fax:+55 83 3315-3471

e-mail: mhelenact@zipmail.com.br

## Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a fotobiomodulação do *Light Emitting Diode* (LED) vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau, através de parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, entre 200 e 250 gramas, divididos aleatoriamente em grupos: controle (CTR) (n=20), LED vermelho (VERM) (n=20) e LED verde (VERDE) (n=20), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias). As aplicações do LED vermelho ( $\lambda=630\text{nm}\pm 10\text{nm}$ , 300 mW,  $9\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto, 30 segundos) e LED verde ( $\lambda=520\pm 30\text{nm}$ , 180 mW,  $60\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto, 30 segundos) foram realizadas diariamente, de forma pontual, em quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida (total:  $36\text{J}/\text{cm}^2$  no VERM e  $240\text{J}/\text{cm}^2$  no VERDE), com exceção do dia da eutanásia. Após a eutanásia dos animais, realizou-se a avaliação do índice de retração da ferida (IRF). Sob microscopia de luz, cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina foram avaliados quanto à superfície a ser reepitelizada e ao índice angiogênico (IA) (x400), através do programa *Image J* (versão 1.50i). Na análise imuno-histoquímica, o anticorpo anti- $\alpha$ -SMA foi utilizado para identificar, nas áreas mais superficiais do tecido conjuntivo, as maiores quantidades de miofibroblastos. O LED vermelho, aos 14 e 21 dias, induziu uma melhor reepitelização e IRF superior ao CTR ( $p=0,095$ ) e ao VERDE ( $p=0,001$ ), já o LED verde promoveu maior angiogênese em todos os períodos avaliados, e uma quantidade de miofibroblastos superior aos demais grupos aos 21 e 28 dias. Em conclusão, os LEDs vermelho e verde mostraram efeitos benéficos à cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

**Palavras-chaves:** Fototerapia; Queimaduras; Cicatrização; Miofibroblastos; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

## Introdução

As queimaduras são um problema global de saúde pública e representam cerca de 180 mil mortes por ano, ocorrendo em sua maioria em países de baixa e média renda [1]. São definidas como lesões traumáticas, causadas principalmente pelo calor, radiação, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos, estando a sua gravidade diretamente relacionada com a profundidade da lesão gerada, podendo ser classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau [1,2].



As queimaduras de terceiro grau são definidas como lesões de alta complexidade, por sua extensão, que envolvem todas as estruturas da pele e seus anexos, podendo atingir músculos e estruturas ósseas, e eventualmente podem cicatrizar com retração das bordas, deixando deformidades ou cicatrizes [3-5].

O desenvolvimento de terapias que promovam o reparo do tecido queimado de forma rápida, eficaz e que reduzam os custos do tratamento, representa um grande benefício para a qualidade de vida do paciente. Entre as terapias utilizadas, destaca-se a fototerapia com uso do *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (LASER) [5-8] ou do *Light Emitting Diode* (LED) [9-12].

A fototerapia melhora a produção de adenosina trifosfato (ATP), essencial para o metabolismo energético celular, aumenta a síntese proteica e estimula a microcirculação por melhora da contribuição nutricional, o que, associado ao aumento da atividade mitótica, resulta em multiplicação celular facilitada e na formação de novos vasos a partir de outros já existentes [13,14].

Embora os LASERs promovam o aumento da atividade celular durante a cicatrização de feridas, sendo os estímulos à angiogênese um dos mais relatados, apresentam limitações em relação ao comprimento de onda ideal utilizado e ao tamanho das feridas que podem ser tratadas pelo seu feixe de luz. Em contraste, a luz LED permite o controle da composição espectral e pode ser organizado em matrizes de todos os tamanhos para o tratamento de pequenas ou grandes áreas da pele [15-17].

Recentemente, diversos estudos têm avaliado a ação do LED no processo de cicatrização de feridas e queimaduras [9-11], apresentando-se como uma alternativa eficaz ao uso de fontes de luz, reduzindo os custos de aquisição e tratamento, já que são gerados em dispositivos mais baratos [4,18-20]. A fototerapia por LED promove diminuição significativa no número de células inflamatórias [10,11,21], redução da área da ferida, aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno [9,16,22].

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a fotobiomodulação do LED vermelho e verde no processo de reparo em queimaduras de terceiro grau, através de parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostra**

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, massa entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) na cidade de Campina Grande-PB. Os animais receberam água *ad libitum*, ração padronizada e foram mantidos sob temperatura controlada em  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro). Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão 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).

### **Grupos experimentais**

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

### **Indução da Queimadura**

Os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (*Cetamin*<sup>®</sup>, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (*Dopaser*<sup>®</sup>, Hertape, Juatuba, MG, Brasil) aplicada na região intraperitoneal. Constatado o plano anestésico profundo, realizou-se a tricotomia da região dorsal, utilizando lâmina de barbear (*LORD*<sup>®</sup> Co., Alexandria, Egito) e digluconato de clorexidina 4% (*Riohex*<sup>®</sup> 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). A queimadura foi realizada no dorso dos animais com um instrumento de ferro, com  $1\text{cm}^3$ , aquecido 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 a metodologia descrita por Meyer e Silva [23] e modificada por Catão *et al.* [4]. As queimaduras foram confirmadas por meio da análise histológica das lâminas coradas em hematoxilina e eosina, onde foi observada a destruição total da epiderme e derme, e degradação do tecido muscular, característico das queimaduras de terceiro grau.

### **Fototerapia**

Foram utilizados neste estudo o LED vermelho de  $\lambda=630\text{nm}\pm 10\text{nm}$  (*LED Bios Therapy II*<sup>®</sup>, Bios Indústria e Comércio, São José dos Campos, SP, Brasil) e o LED verde de  $\lambda=520\pm 30\text{nm}$  (*D-Light Green*<sup>®</sup>, Kordontec, São Paulo, SP, Brasil). As aplicações do LED vermelho (300 mW, 9J/cm<sup>2</sup> por ponto, 30 segundos) e verde (180 mW, 60J/cm<sup>2</sup> por ponto, 30 segundos) foram realizadas diariamente, de forma pontual, em quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida (total: 36 J/cm<sup>2</sup> no VERM e 240 J/cm<sup>2</sup> no VERDE), com exceção do dia da eutanásia. Os animais do grupo CTR receberam a simulação do tratamento com o equipamento de LED desligado.

### **Eutanásia**

Após o período experimental, os animais seguiram para eutanásia, sendo alojados em caixas hermeticamente fechadas, com algodão embebido com halotano (*Tanohalo*<sup>®</sup> 1ml/ml, *Cristália*, Itapira, SP, Brasil). A morte foi constatada por dois avaliadores, previamente calibrados, por meio da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos dos animais.

### **Índice de Retração da Ferida (IRF)**

Para a avaliação do IRF, as lesões foram fotografadas após indução da queimadura e no dia da eutanásia dos animais com câmera fotográfica digital, a uma distância padronizada de 15 cm do dorso do animal, e analisadas no programa gratuito *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). Em seguida, a ferida foi detalhadamente contornada por um único avaliador, sem conhecimento prévio do grupo analisado. O IRF foi calculado pela equação:

$$\text{IRF (\%)} = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}}{\text{área inicial}} \times 100.$$

### **Análise Morfológica**

Constatada a morte do animal, a ferida foi excisada com bisturi e tesouras estéreis, respeitando-se uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm. Os espécimes, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessuras e corados com hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (*ICC 50HD, Leica Microsystem*

*Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), um único avaliador, previamente treinado e desconhecendo os grupos analisados, realizou a avaliação da superfície a ser reepitelizada das feridas segundo os critérios utilizados por Meireles *et al.*[24] (Quadro 1).

Para a avaliação do IA, foi adaptada a metodologia proposta por Medeiros *et al.* [8]. Foram realizadas fotomicrografias (*ICC 50HD, Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*) em dez campos ( $\times 400$ ) de maior vascularização por espécime, localizadas nas áreas mais superficiais do tecido conjuntivo. As imagens obtidas foram transferidas para um computador e os vasos sanguíneos contabilizados com auxílio do programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). Por fim, foi estabelecida a mediana dos vasos sanguíneos, para cada animal.

### **Análise Imuno-Histoquímica**

O tratamento imuno-histoquímico foi realizado a fim de identificar as maiores quantidades de miofibroblastos, caracterizados pela positividade citoplasmática ao anticorpo anti- $\alpha$ -SMA (diluição: 1:15000; clone: 1A4; Abcam, *EUA*).

Os espécimes, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes de 3 $\mu$ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (*3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA*). Em seguida, o material foi imerso em peróxido de hidrogênio 3%, para bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após a incubação do anticorpo primário em solução diluente (*Antibody diluent, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (60 minutos), os cortes foram submetidos ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal<sup>TM</sup>, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA*). A diaminobenzina foi utilizada para visualizar a atividade da peroxidase (*Liquid DAB + Substrate System, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), resultando em uma reação acastanhada do produto. As secções foram contra coradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e foram realizadas as montagens em resina *Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, US)*. Como controle positivo interno, foram utilizados os vasos sanguíneos, por meio da imunorreatividade das células musculares lisas que os circundam. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário.

Após o processamento, foram realizadas fotomicrografias em dez campos ( $\times 400$ ), adaptando a metodologia de Medeiros *et al.*[8], e as células imunorreativas ao anti- $\alpha$ -SMA,

contabilizadas com auxílio do programa *Image J* versão 1.50i (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). Por fim, foi estabelecida a média de células imunorreativas, para cada animal.

## **Análise Estatística**

Para análise estatística, foi utilizado o programa *IBM SPSS Statistics 20.0 program* (*IBM Corp., Armonk, NY, USA*). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O IRF, IA e a quantidade de miofibroblastos, foram analisados através do teste de Mann-Whitney. Os dados referentes à superfície a ser reepitelizada foram analisados descritivamente. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

### **Índice de Retração da Ferida (IRF)**

Aos 7 dias, as feridas dos grupos tratados tiveram uma menor retração, com IRF do grupo CTR (mediana: -40%; variação: -60 a -33) superior ao VERDE (mediana: -76%; variação: -88 a -1,3) ( $p=0,04$ ) e ao VERM (mediana: -81%; variação: -125 a -43) ( $p=0,01$ ). Após 14 dias, o IRF do grupo VERM (mediana: 10%; variação: -35 a 76) foi superior ao CTR (mediana: -17%; variação: -84 a 27) ( $p=0,095$ ) e ao VERDE (mediana: -60%; variação: -75 a -12) ( $p=0,001$ ). Assim como no período anterior, em 21 dias, o IRF do VERM (mediana: 84%; variação: 92 a 76) se manteve superior ao CTR (mediana: 77%; variação: 61 a 92) ( $p=0,36$ ) e ao VERDE (mediana: 57%; variação: -16 a 94) ( $p=0,02$ ). No último período, 28 dias, os IRF de todos os grupos foram semelhantes: grupo CTR (mediana: 96%, variação: 83 a 100), VERM (mediana: 100%; variação: 91 a 100) e VERDE (mediana: 100%, variação: 91 a 100), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Fig. 1 a e b).

### **Superfície a ser Reepitelizada**

Após 7 da indução da queimadura, observou-se escore 1 em 80% ( $n=4$ ) dos casos do grupo VERDE (Fig. 2a) e em 60% ( $n=3$ ) dos casos do grupo VERM, enquanto a maioria dos casos do CTR, 60% ( $n=3$ ), apresentaram escore 0 (Fig. 3). Em 14 dias, o escore 1 foi

observado em todos os casos (n=5) do grupo CTR e VERDE, e 20% (n=1) dos casos do grupo VERM já apresentava escore 2 (Fig. 2b). Verificou-se reepitelização completa (escore 4) em 60% (n=3) dos animais do VERM, reepitelização irregular (escore 3) em 20% (n=1) dos animais do VERDE (Fig. 2c) e predominância do escore 2 em 60% (n=3) dos casos no CTR, após 21 dias da queimadura (Fig. 3). Aos 28 dias, 80% (n=4) dos animais do grupo VERM apresentaram reepitelização completa (escore 4), enquanto que no CTR e no VERDE, esse percentual foi de 60% (n=3) (Fig. 2d).

### **Índice Angiogênico (IA)**

Aos 7 dias, observou-se maior IA no grupo VERDE (mediana: 8,4; variação: 5,8 a 9,8) (Fig. 2a) quando comparado ao CTR (mediana: 4,4; variação: 1,4 a 8,4) ( $p=0,02$ ) e ao VERM (mediana: 6,4; variação: 5,2 a 10,2) ( $p=0,28$ ). Em 14 dias, o IA do grupo VERDE (mediana: 5,8; variação: 1,2 a 7,6) foi superior ao VERM (mediana: 4,4; variação: 1,6 a 8,0) ( $p=0,83$ ) e ao CTR (mediana: 4,0; variação: 2,8 a 6,2) ( $p=0,46$ ), porém sem diferença estatística significativa entre os grupos. Após 21 dias da queimadura, notou-se que o IA do VERDE (mediana: 6,4; variação: 1,8 a 10,2) também foi superior (Fig. 2c), quando comparado ao grupo VERM (mediana: 3,8; variação: 2,2 a 6,2) ( $p=0,06$ ). O grupo VERDE, aos 28 dias, apresentou IA superior (mediana: 5,4; variação: 3,0 a 9,6) ao VERM (mediana: 1,8; variação: 0,8 a 6,4) ( $p=0,04$ ) e ao CTR (mediana: 4; variação: 0,2 a 5,8) ( $p=0,09$ ) (Fig. 4).

### **Miofibroblastos**

Aos 7 dias, houve maior quantidade de miofibroblastos no grupo VERM (mediana: 7; variação: 0,9 a 11,3) quando comparado ao CTR (mediana: 5,2; variação: 1,3 a 9,7) ( $p=0,44$ ) e ao VERDE (mediana: 2,5; variação: 1,4 a 5,6) ( $p=0,04$ ). 14 dias após a queimadura, o grupo CTR apresentou quantidade de miofibroblastos superior (mediana: 24,4; variação: 22,3 a 28,1) (Fig. 2e) ao VERDE (mediana: 20,9; variação: 14,9 a 24,5) ( $p=0,047$ ) e ao VERM (mediana: 13,9; variação: 11,8 a 21,4) ( $p=0,009$ ). Em 21 dias, foi observado maior número de miofibroblastos no grupo VERDE (mediana: 26,5; variação: 20,8 a 35,5) (Fig. 2f), quando comparado ao VERM (mediana: 23,5; variação: 6,6 a 29,6) ( $p=0,09$ ) e ao CTR (mediana: 15; variação: 11,9 a 27,7) ( $p=0,04$ ). O grupo VERDE também apresentou maior quantidade de miofibroblastos, aos 28 dias, (mediana: 22,7; variação: 0,6 a 30) quando comparado ao

VERM (mediana: 21,7; variação: 18,7 a 26,1) ( $p=0,75$ ) e ao CTR (mediana: 18,8; variação: 13,6 a 28) ( $p=0,60$ ) (Fig. 5).

## Discussão

Benefícios terapêuticos da fotobiomodulação no tratamento de feridas cutâneas têm sido relatados em diversas pesquisas, como diminuição da área da ferida, aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno [9,14,15,22]. Entretanto, verifica-se que há poucos estudos na literatura que avaliem a fotobiomodulação dos LEDs vermelho e verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

Sabe-se também que as terapias com LASERs de baixa potência e LEDs, são capazes de melhorar a viabilidade do retalho cutâneo, aumentando a angiogênese. No entanto, o mecanismo para a formação de novos vasos sanguíneos não é completamente compreendido [25,26,27].

O modelo experimental utilizado neste estudo tem sido empregado com sucesso para avaliar os efeitos da luz na cicatrização de queimaduras de terceiro grau [4,10]. Na análise do IRF foram observados valores negativos, principalmente aos 7 dias, decorrentes possivelmente do edema intersticial que aumenta as dimensões macroscópicas da ferida, como sugerido por Catão et al.[4]. Aos 14 e 21, notou-se uma maior retração das áreas das feridas do VERM quando comparado ao grupo CTR e VERDE. Fiório et al. [21] ao avaliar a regressão de queimaduras de terceiro grau em ratos, observaram uma redução significativa na área da ferida do grupo tratado com LED vermelho, no 16º dia.

As células-chave do processo de contração da ferida são os miofibroblastos, caracterizados pela expressão da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), desempenham um papel importante na contração e maturação do tecido de granulação [28,29,30].

Aos 7 dias, o grupo VERM apresentou maior quantidade de miofibroblastos quando comparado ao CTR e ao VERDE, entretanto, este resultado não se manteve durante os períodos seguintes. O grupo VERDE apresentou maior diferenciação miofibroblástica nos estágios finais do processo (21 e 28 dias) (Fig. 2f), o que corrobora com os achados de Choen et al [31].

Em todos os períodos analisados, o LED verde ( $\lambda=520 \pm 30$  nm) estimulou a proliferação de vasos sanguíneos, o que sugere efeitos positivos da fotoindução na formação vascular com base nos parâmetros utilizados. Relatos semelhantes foram apontados por Fushimi et al. [9] e Sousa et al. [16] ao avaliarem o LED verde na cicatrização de feridas

cutâneas induzidas por punch. A fototerapia com LED verde pode ter gerado um aumento na produção de interleucina-8 (IL-8) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), contribuindo para o restabelecimento do fluxo sanguíneo local [9].

Após 21 dias, 80% (n=4) dos animais do grupo VERDE não tinham atingido a reepitelização completa, estando à superfície da ferida ainda descoberta. Uma das possíveis explicações, é que a luz verde tenha sido melhor absorvida pelo tecido nos períodos iniciais e por este motivo, o número de vasos sanguíneos deste grupo tenha sido superior quando comparado ao CTR e VERM, já que no processo cicatrização, o número de vasos sanguíneos diminui à medida que o tecido torna-se mais maduro [3,6,25].

Cheon et al. [31] ao examinar o efeito da irradiação de LED verde ( $\lambda=525$  nm) na cicatrização de feridas decorrentes de incisões, observou que esta pode induzir a proliferação celular e a reepitelização durante o processo de cicatrização, contrariando os resultados deste estudo. Cabe destacar que no estudo de Cheon et al. [31] as aplicações ocorreram durante 9 dias, com duração de uma hora a cada aplicação.

Foram avaliados os efeitos da irradiação do LED vermelho ( $\lambda=630 \pm 10$ nm) e verde ( $\lambda=520 \pm 30$  nm) no tratamento de queimaduras de terceiro grau. Considerando os resultados encontrados, sugere-se que futuras pesquisas sejam realizadas a fim de avaliar com mais detalhes os efeitos do LED vermelho e verde, bem como a sua associação, na cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

## Conclusões

Em conclusão, os LEDs vermelho e verde mostraram efeitos benéficos à cicatrização de queimaduras de terceiro grau. O LED vermelho, aos 14 e 21 dias, induziu uma melhor reepitelização e maior retração da ferida, já o LED verde promoveu maior angiogênese, aos 7, 14, 21 e 28 dias, e uma quantidade de miofibroblastos superior aos demais grupos aos 21 e 28 dias.

## Referências

1. World Health Organization (2016) Burns. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>. Accessed 10 de April 2018.
2. Martin NA, Falder S (2017) A review of the evidence for threshold of burn injury. Burns 43: 1624-1639. doi: 10.1016/j.burns.2017.04.003.



3. Busuioc CJ, Popescu FC, Mogosanu GD, Lascar 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: 887-895.
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. 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.
6. 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.
7. Chiarotto GB, Neves LM, Esquisatto MA, Amaral ME, Santos GM, Mendonça FA (2014) Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. *Lasers Med Sci* 29:1685-1693. doi: 10.1007/s10103-014-1573-9.
8. Medeiros ML, Araújo-Filho I, Silva EM, Sousa Queiroz WS, Soares CD, Carvalho MG et al (2017) 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.
9. 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.1524475X.2012.00771.x.
10. 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.
11. Silveira PCL, Ferreira KB, Rocha FR, Pieri BL, Pedroso GS, Souza CT, Nesi RT, Pinho RA (2016) Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on inflammatory response in burn wound healing. *Inflammation* 39:1395-1404. doi: 10.1007/s10753-016-0371-x.
12. Melo MS, Alves LP, Fernandes AB, Carvalho HC, Lima CJ, Munin E et al (2018) LED phototherapy in full-thickness burns induced by CO<sub>2</sub> laser in rats skin. *Lasers Med Sci*. doi: 10.1007/s10103-018-2515-8.
13. Dall Agnol MA, 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.
14. 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.
15. Oliveira Sampaio SCP, Monteiro JSC, Cangussú MCT, Santos GMP, Santos MAV, Santos JN et al (2013) Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous

wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci* 28:799-806. doi 10.1007/s10103-012-1161-9.

16. 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.

17. Kim WS, Calderhead RG (2011) Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Therapy* 20:205-215. doi: 10.5978/islsm.20.205.

18. Torres CR, Barcellos DC, Batista GR, Borges AB, Cassiano KV, Pucci CR (2011) Assessment of the effectiveness of light-emitting diode and diode laser hybrid light sources to intensify dental bleaching treatment. *Acta Odontol Scand* 69:176-81. doi: 10.3109/00016357.2010.549503.

19. Chang MH, Das D, Varde PV, Pecht M (2012) Light emitting diodes reliability review. *Microelectron Reliab* 52:762-782. doi: 10.1016/j.microrel.2011.07.063.

20. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR (2013) Lowlevel laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32: 41–52.

21. 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.

22. Neves SMV, 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 ( $\lambda 640 \pm 20$  nm) on the repair of third-degree burns in rats. *Lasers Med Sci* 29:2013-312. doi:10.1007/s10103-013-1312-7.

23. Meyer TN, Silva AL (1999) A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras*. doi:10.1590/S0102-86501999000400009.

24. 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.

25. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM et al (2006) Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 24:121-128. doi: 10.1089/pho.2006.24.121.

26. Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy (2005) *Photomed Laser Surg* 23:78-80. doi:10.1089/pho.2005.23.78.

27. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI (2004) Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry* 69:81-89.

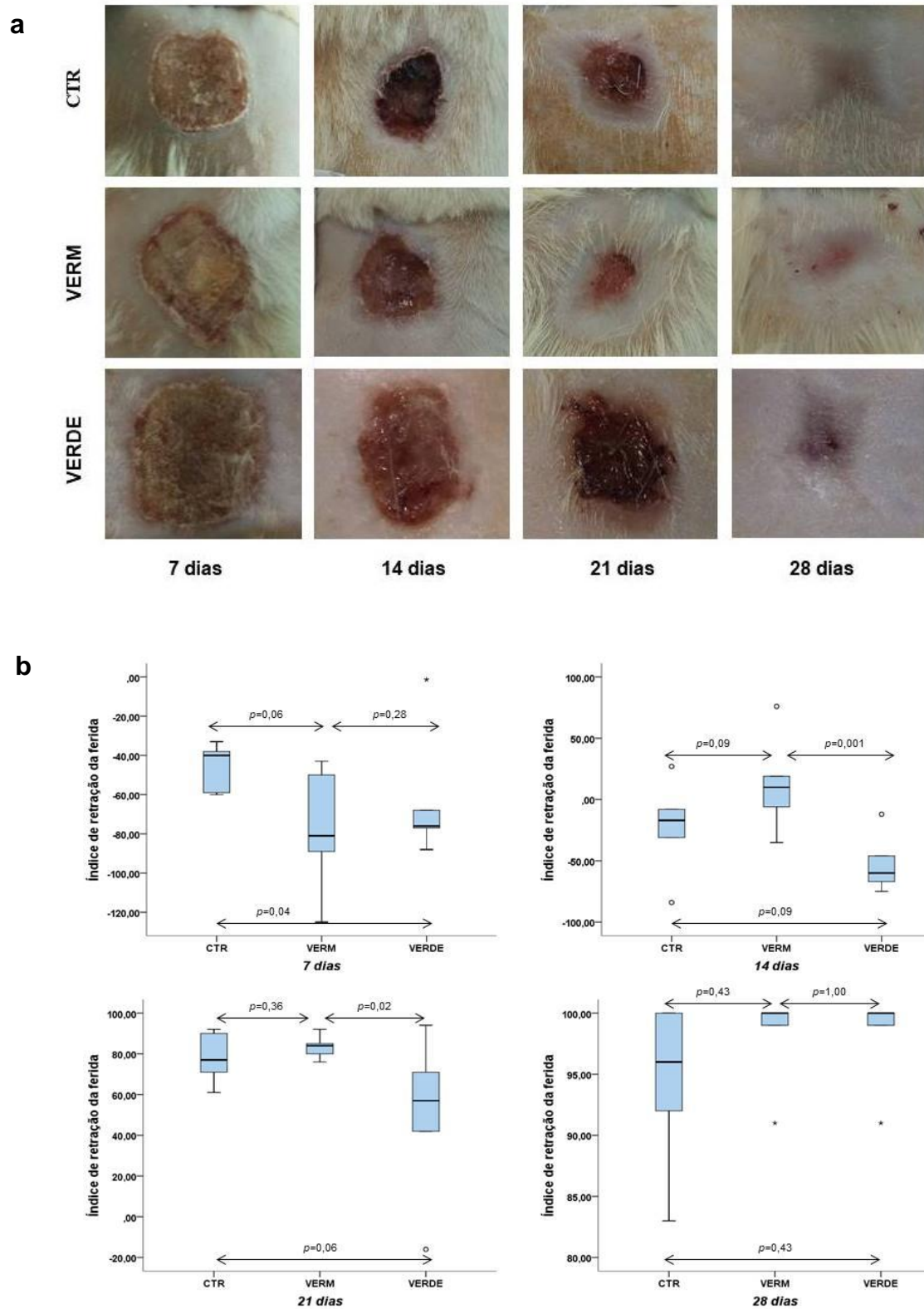
28. Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K (2014) The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/747584.

29. Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200:500-503. doi:10.1002/path.1427.

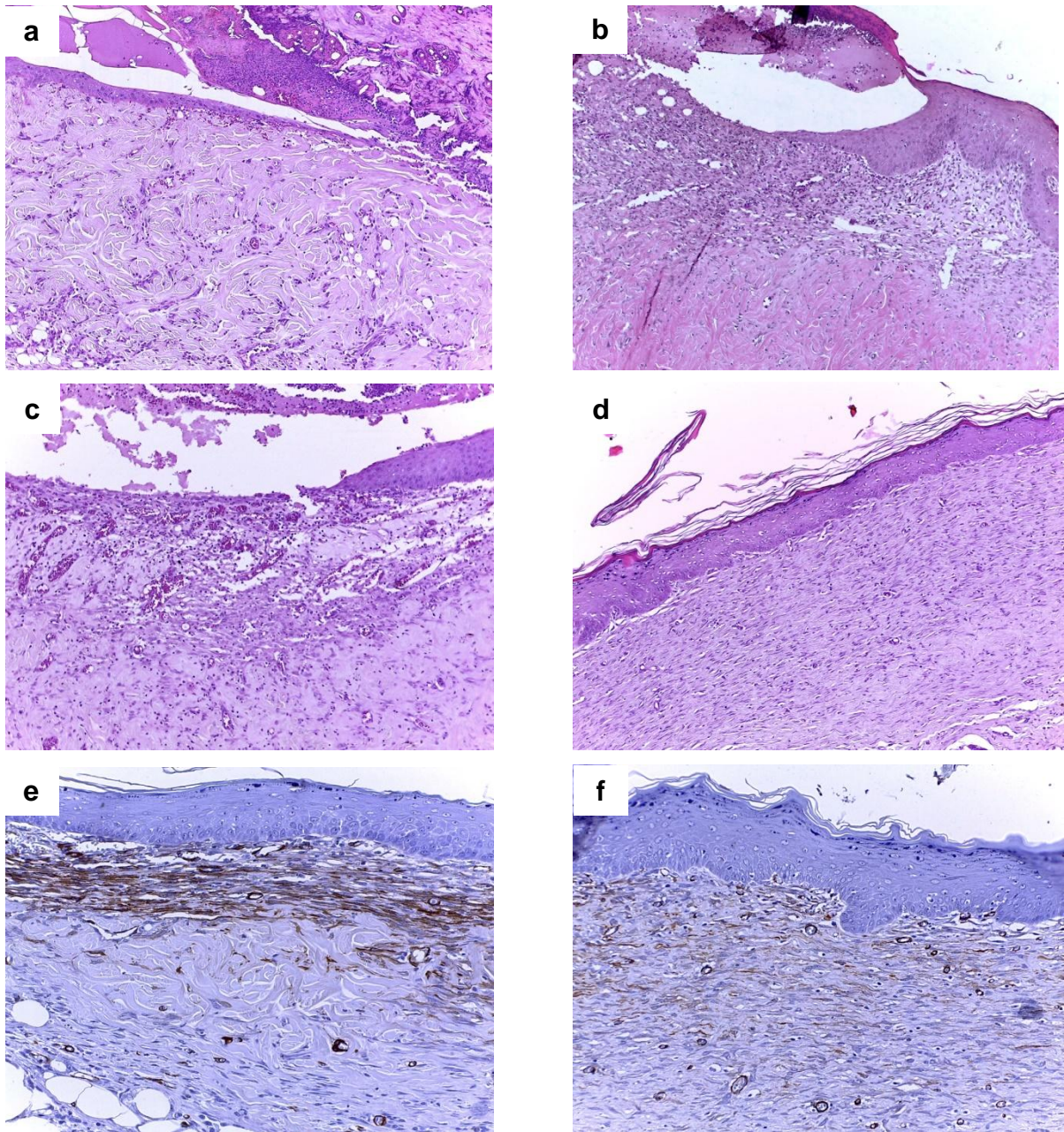
30. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière, A (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 7:301-311. doi: 10.2147/CCID.S50046.
31. Cheon M-W, Park Y-P (2010) Wound Healing Effect of 525 nm Green LED Irradiation on Skin Wounds of Male Sprague Dawley Rats. *Trans Electr Electron Mater* 11: 226. doi: 10.4313/TEEM.2010.11.5.226.

**Quadro 1** Critérios utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada (MEIRELES et al., 2008)

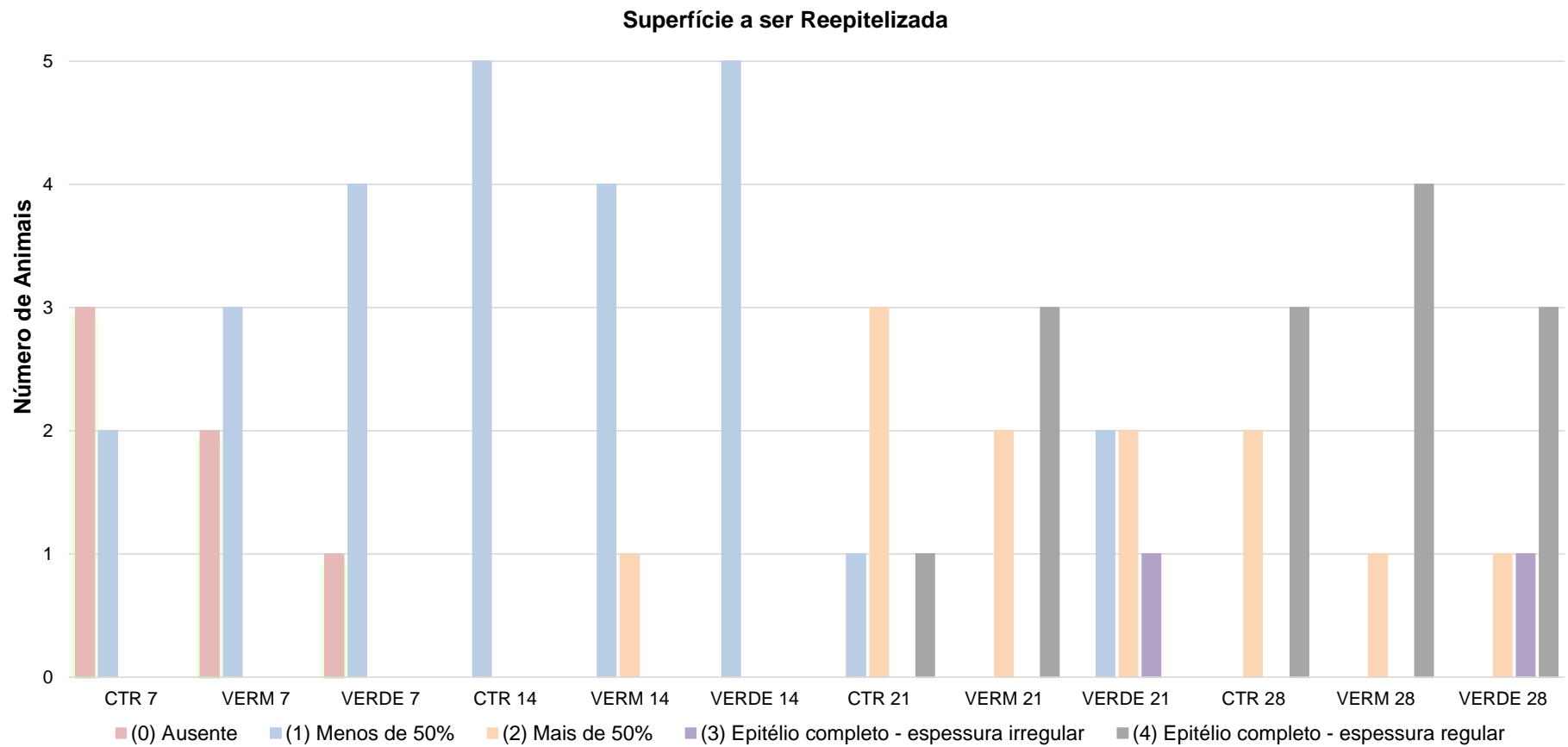
ESCORES	DESCRIÇÃO
<b>Reepitelização</b>	Ausente (0) Presente, cobrindo <50% da ferida (1) Presente, cobrindo >50% da ferida (2) Presente, cobrindo 100% da ferida, com espss irregular (3) Presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular (4)



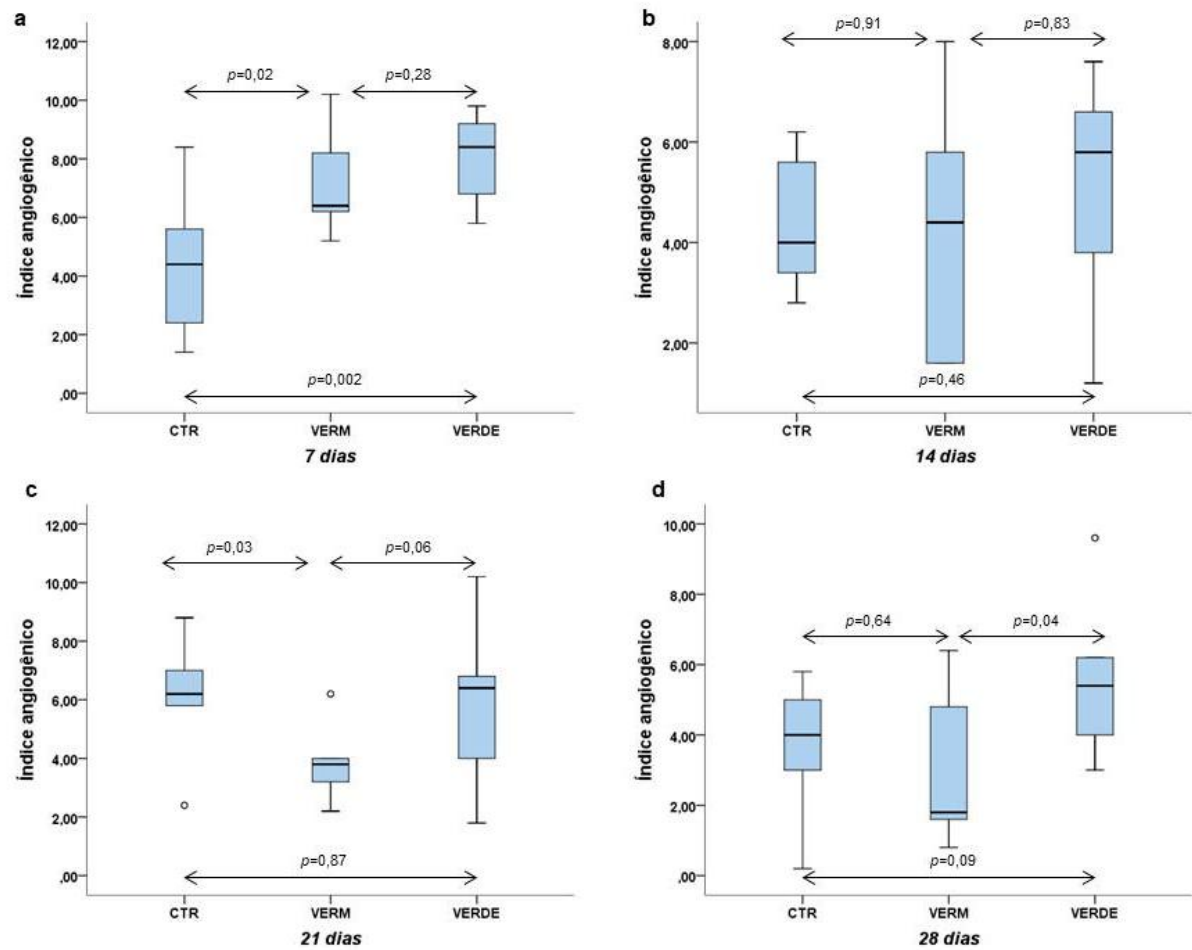
**Fig. 1** a Retração clínica das feridas até 28 dias após a queimadura. b Gráfico box plot ilustrando a retração das feridas nos grupos experimentais e nos diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias)



**Fig. 2** a Ferida do grupo VERDE aos 7 dias exibindo início de reepitelização e numerosos vasos sanguíneos de pequeno calibre no tecido conjuntivo subjacente (Hematoxilina e eosina, 100x). b Ferida em processo de reepitelização no grupo VERM aos 14 dias. Destaque para a reação de granulação em áreas superficiais do tecido conjuntivo e para a maior deposição de colágeno em áreas mais profundas (Hematoxilina e eosina, 100x). c Reepitelização incompleta da ferida e tecido conjuntivo exibindo diversos vasos sanguíneos ingurgitados no grupo VERDE aos 21 dias (Hematoxilina e eosina, 100x). d Reepitelização completa no grupo CTR aos 28 dias, com ocasionais vasos sanguíneos de pequeno calibre e discreto infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo subjacente (Hematoxilina e eosina, 100x). e Miofibroblastos em região superficial do tecido conjuntivo, dispostos paralelamente à superfície epitelial, em ferida do grupo CTR aos 14 dias (*Reveal*, 200x). f Numerosos miofibroblastos em ferida do grupo VERDE aos 21 dias (*Reveal*, 200x).

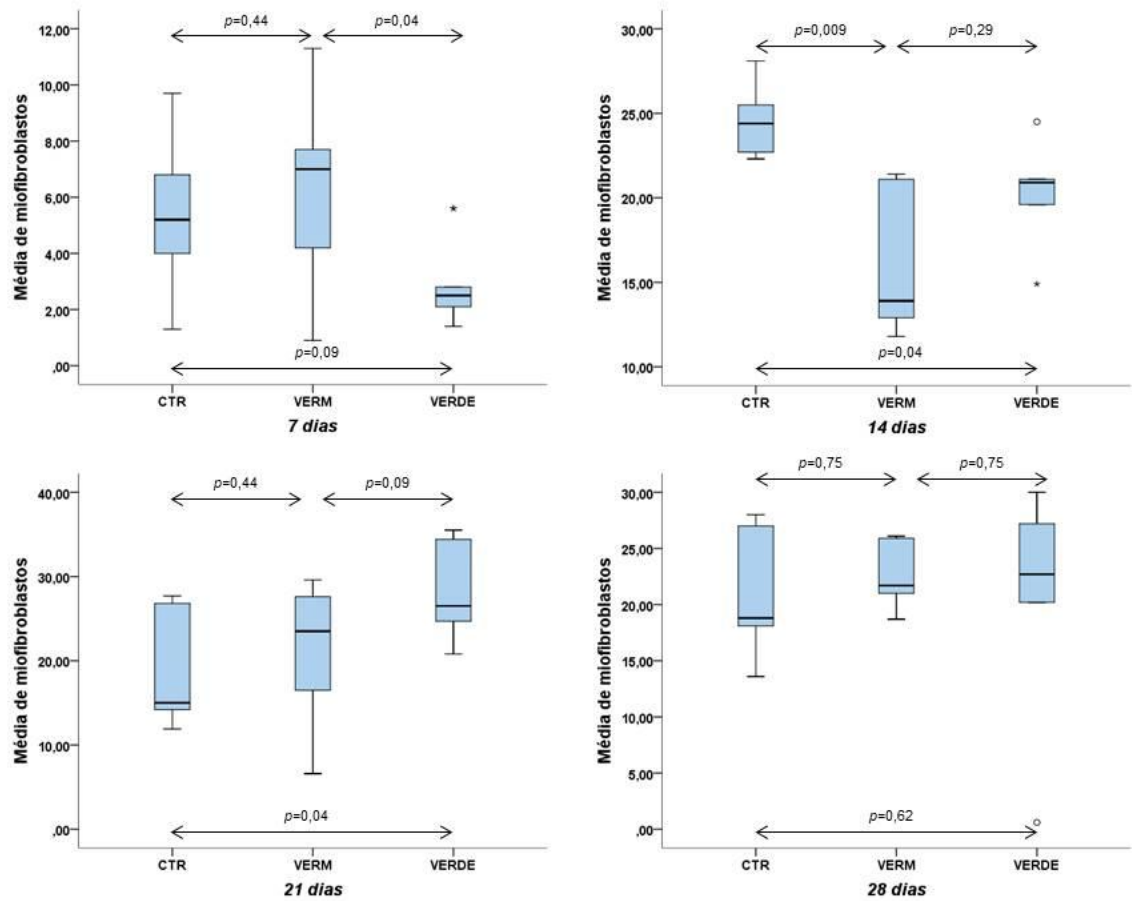


**Fig. 3** Distribuição absoluta dos grupos experimentais quanto aos escores utilizados para avaliação da superfície a ser reepitelizada das feridas em diferentes tempos de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias)



**Fig. 4** Gráfico box plot ilustrando a avaliação do índice angiogênico em queimaduras de terceiro grau de acordo com os grupos experimentais e o tempo de eutanásia





**Fig. 5** Gráfico box plot ilustrando a avaliação da diferenciação miofibroblástica em queimaduras de terceiro grau de acordo com os grupos experimentais e o tempo de eutanásia

*Considerações Finais*

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que os LEDs vermelho e verde, nos protocolos utilizados, podem estimular a contração da ferida, reepitelização, angiogênese e diferenciação miofibroblástica do processo de cicatrização queimaduras de terceiro grau. O LED vermelho, aos 14 e 21 dias, induziu uma melhor reepitelização e maior retração da ferida, já o LED verde promoveu maior angiogênese em todos os períodos avaliados e uma quantidade de miofibroblastos superior aos demais grupos aos 21 e 28 dias.

Considerando os protocolos utilizados, novos estudos deverão ser desenvolvidos a fim de avaliar os resultados apresentados nesta pesquisa e compreender os efeitos fotobiomodulares dos LEDs, principalmente o LED verde, devido à carência de estudos na literatura, na cicatrização de queimaduras de terceiro grau, bem como a possível associação entre as fototerapias.

*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.

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.

ANDERS, J.J.; LANZAFAME, R.J.; ARANY, P.R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomed Laser Surg**, v.33, n.4, p.183-184, 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.

BARDAA, S. *et al.* The evaluation of the healing proprieties of pumpkin and linseed oils on deep second-degree burns in rats. **Pharma Biol.**, v.54, n.4, p.581-587, 2016.

BRASSOLATTI, P. *et al.* Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microsc Res Tech.**, v.79, n.4, 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.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **ABDC Arq Bras Cir Dig.**, v.20, n.1, p.50-58, 2007.

CLARK, R.A.F. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: Pathologic Basis of Disease, 7th ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.

CARREL, A. The treatment of wounds. **JAMA**, v.55, p.2148-2150, 1910.

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, 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.

CHEON, M.W. *et al.* Low level light therapy by Red–Green–Blue LEDs improves healing in an excision model of Sprague–Dawley rats. **Pers Ubiquit Comput**, v.17, n.7, p.1421-1428, 2012.

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 ( $\lambda$ 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.

CRUZ, B.F.; CORDOVIL, P.B.L.; BATISTA, K.N.M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Rev Bras Queimaduras**, v.11, n.4, p.246-250, 2012.

DALL AGNOL, M.A. *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.

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

DE CASTRO *et al.* Do laser and LED phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen? **Lasers Med Sci**, v.29, n.4, p.1405-1410, 2014.

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.

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.

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.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, v.200, n.4, p.500-503, 2003.

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.

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

MARTIN, N.A.; FALDER, S. A review of the evidence for threshold of burn injury. **Burns**, v.43, n.8, p.1624-1639, 2017.

MEDEIROS, M.L. *et al.* Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression 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.

MELLO, P.B. *et al.* Effects of HeNe laser and way of irradiation on healing process of burnt rats. **Fisioter e Pesqui**, v.4, p.6-13, 2007.

MELO, M.S. *et al.* LED phototherapy in full-thickness burns induced by CO<sub>2</sub> laser in rats skin. **Lasers Med Sci**, 2018.

MEYER, T.N.; SILVA, A.L. A standard burn model using rats. **Acta Cir Bras**, v.14, n.4, 1999.

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.

OLIVEIRA SAMPAIO, S.C.P. *et al.* Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers Med Sci**, v.28, n.3, p.799-806, 2013.

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.



PARAGUASSÚ *et al.* Effect of LED phototherapy on relative wound contraction and reepithelialization during tissue repair in hypothyroid rats: morphometric and histological study. **Lasers Med Sci**, v.29, n.2, p.773-779, 2014.

REINKE, J.M; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, v.49, p.35-43, 2012.

SHOLAR, A. D. *et al.* The specialized wound care center A 7-years experience at tertiary care hospital. **Ann Plast Surg**, v.58, n.3, p.279–284, 2007.

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. *et al.* Effect of LED phototherapy (170020nm) on TGF- $\beta$  expression during wound healing: an immunohistochemical study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, v.29, n.9, p.605-611, 2011.

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


TORRES, C.R. *et al.* Assessment of the effectiveness of light-emitting diode and diode laser hybrid light sources to intensify dental bleaching treatment. **Acta Odontol Scand**, v.69, n.3, p.176-181, 2011.

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: 10 de Abril de 2018.

*Anexos*


## ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Centro de Estudos Superiores  
e Especializados



CEUA  
Comissão de Ética no Uso de Animais



**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 Argemiro de Figueiredo, 1991 - Paraiti  
 CEP: 58104-506 - Campina Grande, PB Fone: 53 2101.2000  
 www.cesed.br | info@cesed.br | fcm@cesed.br | esed@cesed.br  
 CNPJ: 02.198.023/0001-40

**ANEXO B.** Normas para submissão de trabalhos ao 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/s00421-0080955-8

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 abovementioned 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.

*Apêndices*









