



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

LAÍS GONZAGA DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS: ESTUDO CLÍNICO E HISTOLÓGICO EM RATOS**

CAMPINA GRANDE-PB

2022

LAÍS GONZAGA DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS: ESTUDO CLÍNICO E HISTOLÓGICO EM RATOS**

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

Área de concentração: Estudos dos processos e terapias relacionados aos agravos à saúde bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão.

CAMPINA GRANDE-PB

2022

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.

F224a Farias, Laís Gonzaga de.
Avaliação da fotobiomodulação na reparação de feridas cutâneas [manuscrito] : Estudo clínico e histológico em ratos / Laís Gonzaga de Farias. - 2022.
69 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

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

1. Laserterapia. 2. Feridas. 3. Cicatrização. 4. Doenças na pele. I. Título

21. ed. CDD 616.994

LAÍS GONZAGA DE FARIAS

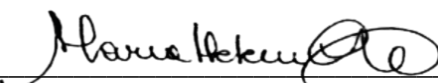
**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS: ESTUDO CLÍNICO E HISTOLÓGICO EM RATOS**

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

Área de concentração: Estudos dos processos e terapias relacionados aos agravos à saúde bucal.

Aprovada em: 10/08/2022.

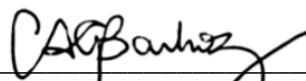
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaca (Examinador interno)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza (Examinador externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

AGRADECIMENTOS

A professora Maria Helena Catão, pelos ensinamentos neste período sou imensamente grata. Sou agradecida pelo acolhimento desde o início, pelos conselhos e experiências, tenha certeza que guardarei com carinho e levarei para minha vida. Aprendi muito com a senhora, sempre incentivando novas perspectivas de estudos com paciência e calma. Minha sincera admiração! Me sinto feliz em ter trabalhado com a senhora e espero nos reencontrarmos nas próximas fases acadêmicas. Que Deus a preserve sempre assim, esse ser humano acolhedor e amável. Saiba que nutro sincera gratidão por tudo o que foi vivido, muito obrigada!

Ao professor Cassiano Nonaka, palavras são insuficientes para expressar minha gratidão. Ao senhor que sempre foi tão acolhedor, não poupou tempo em lembrar-me a manusear um microscópio e auxílio nas demais nuances da pesquisa. Sempre atencioso, correto e extremamente responsável, minha grande admiração, que Deus possa preservá-lo assim. Agradeço a oportunidade de convívio neste período, cheio de crescimento e aprendizado, espero que possamos trabalhar juntos em breve. O senhor é muito especial! Muito obrigada por tudo!

A Deus e a Nossa Senhora por me capacitarem a chegar até aqui.

Aos meus pais Arlene e Diogo, que sempre investiram em minha educação e incentivaram os estudos durante toda minha vida, um adendo especial à minha querida mãe que me alfabetizou e sempre exerceu seu papel como professora de uma forma tão única, sendo meu exemplo para a continuidade deste caminho em nossa família.

Aos meus irmãos Maira e Diago, sinônimo de genuína amizade.

A Arthur, por nossa cumplicidade, amor e companheirismo.

Aos meus familiares, especialmente minha prima, Amanda Gonzaga, sempre disponível desde a época do vestibular, você é inspiração.

Ao professor Carlos Augusto Galvão pela disponibilidade, solicitude e disponibilidade em participar das bancas de qualificação e avaliadora dessa dissertação. Muito obrigada pelas sugestões valiosas e gentileza com as palavras.

Aos companheiros do grupo de pesquisa e colegas da turma de mestrado, minha gratidão.

Em especial a minha querida amiga Letícia Targino, ombro amigo que tenho desde a escola até hoje. Que nossa amizade seja sempre leve e duradoura.

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

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB (PPGO/UEPB), por toda atenção e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos técnicos e demais funcionários do Biotério da UEPB, que gentilmente acompanharam as atividades no biotério.

A todos do laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, pelos momentos de aprendizado, ajuda e companheirismo, em especial, à querida técnica Denize Núbia.

Aos demais funcionários da UEPB, sempre solícitos e generosos.

A todos, que de alguma forma, colaboraram em minha caminhada acadêmica e para o desenvolvimento dessa dissertação, minha gratidão.

RESUMO

As feridas cutâneas são consideradas um problema de saúde pública por sua alta prevalência na população. Dentre as novas terapias estudadas que visam a aceleração e otimização do processo de cicatrização dessas injúrias, tem-se a terapia com a luz laser de baixa intensidade em diferentes comprimentos de onda. O objetivo deste estudo foi avaliar a reparação tecidual de feridas cicatrizadas por segunda intenção em dorso de ratos através de parâmetros clínicos e histopatológicos. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) de Campina Grande-PB. Foram utilizados 60 ratos albinos machos da linhagem *Wistar*, anestesiados e submetidos a uma ferida cutânea excisional na região dorsal com 0,6mm de diâmetro e divididos por randomização simples em 4 grupos experimentais: Grupo Controle (tratamento simulado com aparelho desligado) (n=15); Vermelho ($\lambda=660$ nm, 100 mW, 1 J por ponto, 10 segundos) (n=15); Infravermelho ($\lambda=808$ nm, 100 mW, 1 J por ponto, 10 segundos) (n=15); Combinado: Vermelho e Infravermelho ($\lambda=660$ nm, 100 mW, 0,5 J + $\lambda=808$ nm, 100 mW, 0,5 J) (n=15), irradiados simultaneamente, com subgrupos de 5 animais para cada tempo de eutanásia (03, 07, 14 dias após a lesão). As terapias foram realizadas imediatamente após a indução das lesões e se repetiram a cada 48h, com exceção dos dias de eutanásia. Após eutanásia dos animais nos tempos preestabelecidos, realizou-se a avaliação do Índice de Retração da Ferida (IRF), remoção do espécime e os cortes foram submetidos a coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT). No período de 14 dias ocorreram maiores retrações das feridas, quando comparado aos demais períodos estudados com significância estatística entre os grupos CTRL e COMB ($p=0,09$); CTRL e VERM ($p=0,09$); INFRA e CTRL ($p=0,09$); INFRA e VERM ($p=0,09$). Além disto, a quantidade de células inflamatórias diminuiu ao final do período avaliado principalmente nos grupos COMB e INFRA. O número de mastócitos foi variado e em 14 dias os resultados estatisticamente significativos foram analisados nos grupos INFRA e CTRL em MCT3 ($p=0,11$) e, INFRA x VERM também em MCT3 ($p=0,12$). O grau de reepitelização dos grupos tratados foi completo também aos 14 dias. Destaca-se que com os resultados observados neste estudo, somados à carência de pesquisas que utilizam esses parâmetros, a presente pesquisa abre um campo que merece destaque e futuras investigações.

Palavras-chave: laser; feridas; cicatrização; ratos.

ABSTRACT

Skin sores are considered a public health concern due to their high occurrence rate among the population. Low-level laser therapy (LLLT) with different wavelengths is one of the novel therapies that focus on speeding up and optimising these injuries' healing process. The goal of this study is to evaluate the tissue reparation from secondary intention wound healing in rats through clinic and histopathologic parameters. This research was sent to and approved by the Ethical Animal Use Commission (CEUA) of the State University of Paraíba (UEPB) in Campina Grande-PB. In this study, 60 male albino rats of the Wistar lineage were used. Each of these animals weighed approximately 250g and was 10 weeks old. The animals were anaesthetised and subjected to an excisional skin wound in the dorsal region measuring 0.6mm in diameter and four experimental groups were formed through simple randomization. The groups were: the Control Group (simulated treatment with a turned-off device), the Red Group ($\lambda=660$ nm, 100 mW, 1J per stitch, 10 second) (n=15); the Infrared Group ($\lambda=808$ nm, 100 mW, 1J per stitch, 10 seconds) (n=15); the Combined Group: Red and Infrared ($\lambda=660$ nm, 100 mW, 1J + $\lambda=808$ nm, 100 mW, 1J) (n=15): irradiated simultaneously, with subgroups of 5 animals for each euthanasia period (03, 07, and 14 days after the wound). The therapy sessions occurred immediately after the wounds were introduced and were repeated every 48 hours, except on the day the animal was euthanized. After the animals were euthanized, in their respective predefined days, the Wound Contraction Index (WCI) was evaluated, the specimen was removed, and its tissue cuttings were submitted to hematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue (TBO) staining. The largest wound retractions occurred in the 14-day period, compared to the other periods analysed. Moreover, the amount of inflammatory cells decreased at the end of the period evaluated, the number of mastocytes varied, and the re-epithelialization process in the groups was also completed at the 14-day mark.

Keywords: laser; wound; rats; repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Variáveis dependentes do estudo.....	31
Quadro 2.	Variáveis independentes do estudo.....	31
Quadro 3.	Grupos experimentais do estudo.....	34
Quadro 4.	Características dos tratamentos realizados na pesquisa.....	34
Quadro 5.	Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fotobiomodulação.....	35
Figura 1.	Aspecto final após tricotomia no dorso do animal.....	32
Figura 2.	Aspecto da ferida realizada com o auxílio de <i>punch</i> metálico.....	33
Figura 3.	Aplicação do laser no dorso do animal.....	34
Figura 4.	(A) Mensuração da área exata da ferida através do programa <i>Image J</i> versão 1.50i. (B) Apresentação das medidas em triplicata.....	36
Figura 5.	(A) Remoção do espécime. (B) Espécime removido com gaze estéril..	37
Fig 1.	Avaliação histológica para contagem de neutrófilos e linfócitos (HE; x1000).....	58
Fig 2.	Identificação dos tipos de mastócitos para contagem (campos superficial e profundo) (A) Campo superficial. (B) Campo profundo. (HE; x400).....	58
Fig 3.	Gráfico box-plot ilustrando as células inflamatórias nos grupos experimentais (3, 7 e 14 dias).....	59
Fig 4.	Gráfico box-plot ilustrando os mastócitos tipo 1 nos grupos experimentais (3, 7 e 14 dias).....	59
Fig 5.	Gráfico box-plot ilustrando os mastócitos tipo 2 nos grupos experimentais (3, 7 e 14 dias).....	60
Fig 6.	Gráfico box-plot ilustrando os mastócitos tipo 3 nos grupos experimentais (3, 7 e 14 dias).....	60
Fig 7.	Gráfico box-plot ilustrando a quantidade de mastócitos totais nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de células inflamatórias em todos os grupos.....	58
Tabela 2.	Número de mastócitos tipo 1 em todos os grupos.....	58
Tabela 3.	Número de mastócitos tipo 2 em todos os grupos.....	59
Tabela 4.	Número de mastócitos tipo 3 em todos os grupos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius (unidade de temperatura).
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais.
cm	Centímetro (unidade de comprimento).
cm²	Centímetro quadrado (unidade de comprimento).
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
COMB	Grupo tratado com laser vermelho e infravermelho.
CTRL	Grupo controle.
EGF	Do inglês <i>epidermal growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento epidérmico.
FGF	Do inglês <i>fibroblast growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento fibroblástico.
HGF	Do inglês <i>hepatocysts growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento de hepatócitos.
IL-1	Do inglês <i>interleukyne-1</i> , traduzido como interleucina-1.
INFRA	Grupo tratado com laser infravermelho.
IRF	Índice de Retração da Ferida.
J	Joule (unidade de energia).
kg	Quilograma (unidade básica de massa).
KGF	Do inglês <i>keratinocytes growth factor</i> , traduzido como traduzido como fator de crescimento de queratinócitos.
LBI	Laser de baixa intensidade.
LASER	Do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , traduzido como Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.
LED	Do inglês <i>Light Emitting Diode</i> , traduzido como Diodo Emissor de Luz.
LTDA	Limitada (termo jurídico).
MD	Maryland (estado norte-americano).
MMP	Metalaproteinases.

μm	Micrômetro (unidade de comprimento).
mg	Miligrama (unidade de massa).
ml	Mililitro (unidade de volume).
mW	Miliwatt (unidade de potência).
mm	Milímetro (unidade de comprimento).
Nº	Número.
nm	Nanômetro (unidade de comprimento).
PB	Paraíba (estado do Brasil).
PDGF	Do inglês <i>platelet-derived growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento derivado de plaquetas.
PR	Paraná (estado do Brasil).
SP	São Paulo (estado do Brasil).
TFBM	Do inglês <i>photobiomodulation therapy</i> , traduzido como terapia de fotobiomodulação.
TGF	Fator de crescimento transformante.
TGF-beta	Fator de transformação de crescimento.
TNF	Fator de necrose tumoral.
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba.
USA	Do inglês <i>United States of America</i> , traduzido como Estados Unidos da América.
VEGF	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
VERM	Grupo experimental que recebeu irradiação com o laser vermelho.
λ	Comprimento de onda.
±	Mais ou menos (símbolo matemático).

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
1.1 CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO.....	13
1.2 LASER.....	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	19
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	19
3.3 AMOSTRA.....	19
3.4 VARIÁVEIS.....	19
3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA AMOSTRA.....	20
3.6 MÉTODO EXPERIMENTAL.....	21
3.6.1 Confeção das excisões cirúrgicas.....	21
3.7 TIPO DE TRATAMENTO EMPREGADO NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.8 CARACTERÍSTICAS DO APARELHO LASER.....	24
3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	24
3.10 AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	24
3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	25
3.11.1 Reepitelização e infiltrado inflamatório.....	26
3.11.2 Identificação e quantificação de mastócitos.....	27
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 ARTIGO	29
4.1 APRESENTAÇÃO.....	29
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50
<i>APÊNCICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTE À AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO DA FERIDA (IRF)</i>	55
<i>APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTE À AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO</i>	56
<i>APÊNDICE C – FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTE À AVALIAÇÃO DOS MASTÓCITOS</i>	57
<i>ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS (CEUA)</i>	58
<i>ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS PARA O PERÍODICO LASERS IN MEDICAL SCIENCE</i>	59

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As feridas podem ser definidas como lesões traumáticas localizadas em tecidos do corpo e e na pele sendo causadas principalmente por fatores como fricção, calor, radiação, contato de produtos químicos e eletricidade. Como exemplos de feridas, pode-se citar as queimaduras, lesões por pressão e feridas cirúrgicas que muitas vezes podem culminar em necroses teciduais, aumento no nível de sintomatologia dolorosa e incapacidade (KYAW *et al.*, 2018; REZAIE *et al.*, 2019).

Uma vez que a lesão é formada, a pele possui dois mecanismos a fim de reparação tissular, que são a regeneração e a cicatrização. A regeneração é caracterizada pela substituição de tecido lesionado através de um processo inflamatório agudo que aproxima as bordas epiteliais em direção à região central da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície, permanecendo íntegra a camada basal do epitélio (WOESSNER *et al.*, 2019).

A cicatrização pode ser classificada em dois tipos básicos: por primeira intenção, quando há uma pequena perda de tecido, não havendo impedimento para que as bordas teciduais sejam aproximadas mecanicamente; e por segunda intenção, existindo uma considerável perda tecidual, impossibilitando que as bordas da lesão sejam aproximadas mecanicamente (MORTAZAVI *et al.*, 2016).

Uma cascata de processos é necessária para que haja a cicatrização dessas feridas, sendo esta, coordenada por eventos celulares e moleculares que se interrelacionam para efetiva reconstituição tecidual. Esses processos se desenvolvem ao longo de três períodos sobrepostos: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a de maturação. Diversos fatores podem contribuir para que esses fatos ocorram de forma insatisfatória, ou até mesmo, não ocorram, como a presença de doenças sistêmicas, doenças crônicas, desnutrição, idade, insuficiência renal e diabetes mellitus (SHI *et al.*, 2020).

Alguns métodos como fármacos, materiais e terapias de reparo são estudados a fim de melhorias nos quadros da reparação tecidual em seres vivos. A terapia de fotobiomodulação com laser de baixa intensidade (LBI) é utilizada como relevante recurso para aliviar a sintomatologia dolorosa, devido seus efeitos anti-inflamatórios, e também, empregada para acelerar o processo de cicatrização em casos de lesão muscular, úlceras e queimaduras (LIMA *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2016).

Nesse sentido, estudos *in vivo* voltados à utilização da fotobiomodulação com o laser de baixa potência na cicatrização de feridas se intensificam e têm demonstrado resultados

importantes na neoangiogênese, estímulo da síntese e deposição de colágeno, aumento da quantidade de fibroblastos e contração da ferida (CATÃO *et al.*, 2015; SUZUKI *et al.*, 2016; EISSA *et al.*, 2017; SOLEIMANI *et al.*, 2018; AMADIO *et al.*, 2020; AMINI *et al.*, 2021).

1.1 CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO

A cicatrização de feridas é a fase de reparo desencadeada em praticamente todos os tecidos pós lesão, sendo caracterizada por uma dinamicidade de processos bioquímicos e biológicos incluindo mediadores solúveis, fatores de coagulação, células imunes, células de tecido conjuntivo e componentes da matriz extracelular (GINESTAL *et al.*, 2019).

A lesão vascular desencadeia a angiogênese principalmente após os dois primeiros dias, a fim da formação de novos capilares, o ambiente metabólico da ferida induz a liberação dinâmica de famílias de fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BARDAA *et al.*, 2016; SORG, 2012; FREKRAZAD *et al.*, 2017).

A angiogênese desempenha um papel significativo na patogênese da cicatrização de feridas em decorrência dos seus efeitos micro e macrovasculares, evidenciando uma diminuição da vascularização e da densidade capilar. Mudanças e interferências nesse processo podem ocasionar defeitos de cicatrização de feridas ou transformações em úlceras crônicas, tipicamente observadas na insuficiência venosa e na doença arteriosclerótica (CAMPOS *et al.*, 2020; YADAV; GUPTA, 2017).

Facilitando o processo de entendimento do mecanismo da cicatrização são utilizadas diferentes classificações em relação às fases, denominadas: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação. Incluindo uma etapa precoce, caracterizada por fenômenos vasculares, hemostase, coagulação e mecanismos predominantemente celulares (FREKRAZAD *et al.*, 2017).

O endotélio lesado, assim como as plaquetas, estimulam a cascata de coagulação, liberando fatores de crescimento, como o fator de transformação do crescimento (TGF- β), prostaglandinas e tromboxanos que atraem neutrófilos à região (SILVA *et al.*, 2016). Possuindo funções antimicrobianas, os neutrófilos liberam proteases na eliminação de tecido necrótico, e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) (CAMPOS; BROGES-BRANCO; GROTH, 2007; CHEON *et al.*, 2012).

A segunda fase, denominada proliferativa, é responsável pela cobertura da superfície da

ferida, formação do tecido de granulação e restauração da rede vascular. Nessa etapa se observa o início da reepitelização pela migração de ceratinócitos, proliferação de fibroblastos, angiogênese, produção de colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina, elastina e outras proteínas da matriz extracelular (MEC) e início do fenômeno de contração realizado pelos miofibroblastos. Tais fatores modulam a proliferação de células endoteliais, contribuindo para a proliferação de fibroblastos (ROCHA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013; DARBY *et al.*, 2014).

A última fase da cicatrização é a de maturação ou remodelação na qual se constata maturação das fibras colágenas e redução da quantidade de capilares, por agregação em vasos sanguíneos maiores. A densidade celular e a atividade metabólica do tecido também são reduzidas. Portanto, nessa fase, o tecido cicatricial inicial, caracterizado por fibras colágenas delicadas e desorganizadas, é substituído por uma matriz que se assemelha à derme (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A fase final da cicatrização é caracterizada pela remodelação tecidual e continua por 6 a 24 meses após a lesão inicial. Esse processo envolve a regressão vascular e remodelação do tecido de granulação, além da formação de novos componentes da MEC, como colágeno, elastina e fibronectina, promovidos em parte por PDGF (REINKE; SORG, 2012; PAKYARI *et al.*, 2013).

Havendo perdas mais extensas de células e de tecido, o reparo torna-se mais complexo envolvendo tanto a regeneração quanto a cicatrização, conceituando-se assim, a cura/cicatrização por segunda intenção. Sendo caracterizada quando a reação inflamatória é mais intensa com acúmulo de matriz extracelular (MEC), abundância de tecido de granulação, formação de cicatriz e mediação da contração da ferida por miofibroblastos (ROBBINS & Cotran, 2010)

As maiores diferenças entre a cura de uma ferida por primeira e por segunda intenção são as maiores proporções que a cicatrização por segunda intenção apresenta. A inflamação é demasiadamente mais intensa, envolvendo maior volume de tecido de granulação resultando em aumento na massa de tecido cicatricial e envolvimento da contração da ferida (SARANDY *et al.*, 2018).

A indução do reparo cicatricial em feridas com perda de tecido caracteriza esse tipo particular de fenômeno. A reação inflamatória representa o evento mais precoce a ocorrer após a lesão tecidual, cuja principal função é eliminar eventuais microrganismos e proporcionar a limpeza da ferida. Posteriormente, eventos biológicos, como a formação de novos vasos sanguíneos capilares associados à deposição progressiva e remodelação das fibras colágenas,

culminarão em um reparo cicatricial completo da área lesada (SIMÕES *et al.*, 2021).

Feridas crônicas e cicatrizes hipertróficas são as principais complicações no reparo, que é considerado crônico quando ocorre lentamente em um período superior a 12 semanas com desorganização temporal e espacial de uma ou mais fases da cicatrização normal. Uma série de fatores fisiopatológicos podem causar a falha na cicatrização normal de feridas, entre eles inflamação, infecção, desnutrição, idade, insuficiência renal e diabetes mellitus (HASHEMI, MADANI, ABEDIANKENARI, 2015).

Alternativas e estudos têm sido relatados a fim melhorar os quadros de cicatrização por segunda intenção, que rotineiramente são mais dispendiosos no tempo de cura. Santos *et al.*, (2019) estudaram o uso do extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) de uso tópico a fim da melhoria dessas feridas em ratos machos hígidos, acarretando em resultados estatisticamente significativos devido à supressão da inflamação.

Simões *et al.* (2019) analisaram comparativamente os efeitos do mel, óleo-eosina de copaíba e um produto comercial (fibrinolisinase, desoxirribonuclease e cloranfenicol) com um grupo de 40 ratos machos que foram submetidos a feridas na região central do dorso. Foi constatada que o uso tópico de mel e óleo-resina de copaíba aumenta a contração da ferida, a presença de colágeno tipo I e acelera a cicatrização.

O uso da fotobiomodulação também vem sendo estudado como possível fator facilitador dessas cicatrizações. Oyebode *et al.*, (2021) realizaram uma revisão sobre o uso do laser vermelho e infra vermelho nesse tipo de ferida cutânea. Os resultados obtidos nos 51 estudos avaliados demonstraram os efeitos potencializadores do laser na cicatrização dessas feridas, ativando respostas biológicas eficazes e atividades de sinalização celular.

1.2 LASER

Em busca de melhorias nos processos de cicatrização, terapias são estudadas a fim de se encontrar resultados favoráveis e que possibilitem mudanças na qualidade de vida. Dentre os métodos terapêuticos estudados, estão os tratamentos tópicos com agentes fitoterápicos (AKHOONDINASAB *et al.*, 2015), utilização de biomateriais (BANO *et al.*, 2017), terapia fotodinâmica (TFD) (CATÃO *et al.*, 2015) e o uso de Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou LED (*Light Emitting Diode*) (CATÃO *et al.*, 2015; TRAJANO *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2017).

A fotobiomodulação, anteriormente denominada "Terapia com Luz de Baixa Intensidade", uma das categorias da fototerapia, envolve a aplicação de uma fonte de luz de

baixa potência não térmica e não ablativa predominantemente o Laser ou LED, para estimular ou inibir diretamente processos celulares e biológicos. Os efeitos terapêuticos dependem tanto das características ópticas de cada tecido quanto das propriedades fotofísicas da luz, que incluem parâmetros de irradiação, como comprimento de onda, potência, irradiância, tempo de exposição e frequência de pulso (AVCI *et al.*, 2013; FREITAS; HAMBLIN, 2016; HADIS *et al.*, 2017; YADAV; GUPTA, 2017).

Atualmente observa-se uma gama exponencial do número de pesquisas voltadas para o conhecimento e melhoras no processo de reparo tecidual, se destacando dentre elas as pesquisas utilizando fotobiomodulação e seus efeitos terapêuticos sobre diferentes eventos biológicos como a cicatrização, que pode ser mais eficaz e mais rápida quando tratada com laser, e possivelmente associado à outras terapêuticas (KUFFLER, 2016).

As irradiações (LBI) são realizadas por meios ativos de diodo nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho. Os comprimentos de onda menores atingem uma camada de tecido mais superficial, assim como, os maiores atingem regiões mais profundas (ORYAN *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2016). A fotobiomodulação é amplamente utilizada na cicatrização de feridas orais e cutâneas, em lesões musculares e nervosas, na redução da inflamação e da dor, e na restauração da função do tratamento de várias condições patológicas (YADAV; GUPTA, 2017).

A avaliação da qualidade da cicatrização do tecido irradiado, geralmente é realizada por meio de alguns parâmetros como a análise histomorfométrica (CALISTO *et al.*, 2015), escala analógica visual (CAPON *et al.*, 2010), análise macro e microscópica (SILVA *et al.*, 2013), imunoistoquímica (COLOMBO *et al.*, 2013) e por meio de testes de resistência à tração (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Os resultados desses métodos demonstram que o laser de baixa intensidade apresenta aspectos macro e microscópicos qualitativos e quantitativos que indicam a melhora do processo inflamatório e maior número de fibras colágenas (CALISTO *et al.*, 2015), cicatrização mais rápida com melhor aposição tecidual (TABAKOGLU *et al.*, 2010) sem comprometer a resistência tecidual à tração (TEIXEIRA *et al.*, 2015)

Benefícios como a estimulação ou inibição de atividade biológicas, fisiológicas e proliferativas estão associadas à laserterapia e conseqüentemente à biomodulação por ela proporcionada. Os efeitos são dependentes dos parâmetros selecionados no aparelho como a potência, dose e tempo de emissão, existindo um limite de exposição que determina o alcance de efeitos benéficos ou não. Altas energias acima de limites específicos para diferentes tipos de tecidos podem ser prejudiciais (CHUNG *et al.*, 2012).

Corroborando com os achados de Tsuka, *et al* (2019), a laserterapia aumenta os níveis

de ATP celular, expandindo a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular no centro catalítico da Citocromo c Oxidase e suprimindo algumas citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. Sousa *et al.* (2011) observaram também que o laser vermelho (λ 630nm \pm 10nm) é capaz de inibir a expressão do TGF- β causando maior retração da ferida nos estágios iniciais do processo de cicatrização.

Em estudo conduzido por de Loura Santana, *et al* (2015), a laserterapia apresentou-se mais eficaz quando aplicada no período pós-operatório por uma melhor organização do colágeno e também aumentando o número de miofibroblastos. Apesar de apresentar resultados similares para dose única de 4 J/cm² e em aplicações fracionadas de 1 J/cm², foi claro que a aplicação no período inflamatório foi um fator importante para o aprimoramento do processo de reparo tecidual.

Farias, L.G; Catão, M.H.C (2022) revisaram através de pesquisa bibliográfica, estudos publicados que avaliaram a efetividade da fotobiomodulação no reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos. Todas as pesquisas, obtiveram algum resultado estatisticamente positivo, havendo melhora na cicatrização (SUZUKI *et al.*, 2016; ASGHARI *et al.*, 2017), reepitelização (MEDEIROS *et al.*, 2017) e maturação de colágeno (CATÃO *et al.*, 2015).

O prematuro tratamento das feridas cirúrgicas por meio da aplicação do laser de baixa intensidade pode ser considerado uma estratégia relevante na terapêutica da modulação da resposta inflamatória e aceleração da cicatrização. Prevenção de infecção, diminuição de complicações e tempo de hospitalização, redução de incidência de readmissões hospitalares, e consequentemente, redução significativa dos gastos em serviços de atenção à saúde também podem ser constatados (MOKOENA *et al.*, 2020).

Entretanto, existe uma falta na padronização em relação aos regimes de dosimetria e entrega de luz, assim como em relação às informações referentes aos parâmetros a serem utilizados e adaptados às diferentes espécies e tipos de lesões em tecidos, limitando a compreensão dos mecanismos de ação celulares, bem como, o uso desta modalidade de tratamento.

Dessa forma, esse estudo objetivou avaliar o efeito da terapia da fotobiomodulação em diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa intensidade no reparo tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos, por meio de parâmetros clínicos e histopatológicos, analisando-se o efeito dessa combinação no tecido a fim de uma assertividade quanto ao protocolo a ser utilizado em clínica, buscando uma melhoria dos resultados e impacto positivo para suas aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fotobiomodulação através de diferentes protocolos de irradiação na regeneração de feridas cutâneas por segunda intenção através de parâmetros clínicos e histopatológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clinicamente o grau de retração das feridas;
- Analisar os aspectos macroscópicos das lesões;
- Determinar os índices percentuais de reepitelização nos grupos;
- Quantificar o número de neutrófilos, linfócitos e mastócitos nas áreas das feridas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo tratou-se de uma pesquisa experimental pré-clínica explicativa e *in vivo* com abordagem analítica quantitativa.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba, situada na cidade de Campina Grande, PB, 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, com protocolo de aprovação número **003/2020**.

3.3 AMOSTRA

Foram utilizados 60 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 10 semanas de vida e peso entre 200-250 gramas provenientes do Biotério da Universidade Estadual da Paraíba em Campina Grande/PB. Foram alojados em gaiolas de 1500 cm² do tipo microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar, alojados nestes compartimentos somente três (03) indivíduos, em função do peso ou da idade, a forração das mesmas foi realizada com maravalhas de *Pinus* esterilizada por radiação gama. A ração e água foram filtradas e autoclavadas, a temperatura do Biotério foi de 23± 1°C e umidade relativa de 40 a 60% sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro).

3.4 VARIÁVEIS

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

Quadro 1. Variáveis dependentes do estudo.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NATUREZA	CATEGORIZAÇÃO
Índice de Retração da Ferida (IRF)	Área de retração da ferida. Percentual de retração da área da ferida.	Quantitativa	Cicatrização completa
Superfície a ser reepitelizada	Percentual da superfície da ferida ser reepitelizada.	Semi Quantitativa	0= ausência; 1 = presente, cobrindo <50% da ferida; 2 = presente, cobrindo >50% da ferida; 3 = presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular; 4 = presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular
Infiltrado Inflamatório	Média de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) em dez campos (×1000) na região da ferida avaliada através da análise morfológica.	Quantitativa	-
Mastócitos	Identificação dos três tipos de mastócitos: Mastócitos Tipo 1 Mastócitos Tipo 2 Mastócitos Tipo 3	Quantitativa	-

Fonte: Autor.

Quadro 2. Variáveis independentes do estudo.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NATUREZA	CATEGORIZAÇÃO
Intervenção	Intervenções que foram utilizadas no estudo	Qualitativa	. Controle . Vermelho . Infravermelho . Combinado
Tempo de eutanásia	Tempo em que os animais foram submetidos à eutanásia.	Qualitativa	. 3 dias . 7 dias . 14 dias

Fonte: Autor.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA AMOSTRA

Os animais selecionados para o estudo encontravam-se em bom estado de saúde, com peso aproximado de 200-250g e 10 semanas de idade. Foram excluídos do estudo aqueles animais que não apresentaram características saudáveis e/ou aspectos psicológicos alterados.

3.6 MÉTODO EXPERIMENTAL

Para controle do peso, foi utilizada uma balança de precisão Traveler (Toledo, São Bernardo do Campo, SP, BR). Os animais foram anestesiados previamente ao ato cirúrgico com aplicação intraperitoneal de solução de 100mg/kg de ketamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, BR) e 5 mg/kg de Xilazyna 10% (Dopaser®, Hertape, Juatuba, MG, BR). Após atingir o plano anestésico profundo dos animais, foi realizada a tricotomia do dorso, através do uso de lâmina de barbear adaptada em porta agulha cirúrgico, associado à água com digluconato de clorexina a 0,5% (Rioehx® 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, BR).

Figura 1. Aspecto final após tricotomia no dorso do animal.



Fonte: Autor.

3.6.1 Confeção das excisões cirúrgicas

Anteriormente à confecção da ferida, foi realizada a antissepsia tópica no dorso dos animais utilizando gaze estéril embebida em digluconato de clorexina 2% (Solução de de Clorexina 2%, Maquira® Indústria de produtos odontológicos, LTDA, Maringá, PR, BR). Foi feita no dorso do animal uma ferida cirúrgica com um *punch* de 6 mm de diâmetro. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado por uma única operadora calibrada. Após a indução da ferida foi realizada uma pressão com gaze estéril e soro fisiológico durante dois minutos, a fim de evitar sangramento.

Figura 2. Aspecto da ferida realizada com o auxílio de *punch* metálico.



Fonte: Autor.

3.7 TIPO DE TRATAMENTO EMPREGADO NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 60 animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=15) (Quadro 4). Todos os animais foram anestesiados e tricotomizados na região do dorso no dia 1º do experimento. A ferida cirúrgica foi realizada com um *punch* de 6mm de diâmetro no terço médio do dorso do animal. Após a excisão, os animais foram divididos de maneira aleatória e de acordo com o protocolo de irradiação: Grupo CTRL (Controle): simulação de tratamento com aparelho desligado; Grupo VERM (Laser Vermelho): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, 100 mW, 50s); Grupo INFRA (Laser Infravermelho): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=808\text{nm} \pm 10 \text{ nm}$, 100 mW; 50s); Grupo COMB (Laser Vermelho e Laser Infravermelho aplicados simultaneamente): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm} + \lambda= 808 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$; 100 mW; 50s) (Quadro 4).

A sessão de fototerapia imediata nos pós-operatórios cirúrgicos foi realizada a cada 48h, com exceção do dia da eutanásia. Os tempos de eutanásia serão de 3, 7, 14 dias após a excisão, com subgrupos de 5 ratos para cada tempo.

Quadro 3. Grupos experimentais do estudo.

Grupo	Tratamento	N	T (dias)	Subgrupo (N)
CTRL	Simulação de tratamento com aparelho desligado	15	3, 7 e 14	5
VERM	Irradiação com laser vermelho	15	3, 7 e 14	5
INFRA	Irradiação com laser infravermelho	15	3, 7 e 14	5
COMB	Irradiação com o laser vermelho e infravermelho	15	3, 7 e 14	5

Fonte: Autor.

Quadro 4. Características dos tratamentos realizados na pesquisa.

Amostra (n)	Descrição
Controle (n=15)	Tratamento simulado com o aparelho desligado.
Laser Vermelho (n=15)	Irradiações a cada 48 horas (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central) (660 nm, 100 mW; 115, 2 J cm ² por sessão durante 50 segundos)
Laser Infravermelho (n=15)	Irradiações a cada 48 horas (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central) (808nm, 100 mW, 115, 2 J cm ² por sessão durante 50 segundos)
Laser Vermelho + Infravermelho simultaneamente (n=15)	Irradiações a cada 48 horas (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central) (660 nm + 808nm; 100 mW; 115, 2 J cm ² por sessão durante 50 segundos)

Fonte: Autor.

Figura 3. Aplicação do laser no dorso do animal.

Fonte: Autor.

3.8 CARACTERÍSTICAS DO APARELHO LASER

Foi utilizado como fonte de luz para esse estudo o laser de baixa potência *Therapy EC*[®] (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos – SP, Brasil) com os seguintes parâmetros adotados: Diâmetro da fibra: 600 µm; Meio ativo *InGaAlP*, saída de 100 mW, Comprimento de onda laser vermelho: 660 nm ± 10 nm; Meio ativo *AsGaAl*, saída de 100 mW, Comprimento de onda laser infravermelho: 808 nm ± 10 nm. As informações técnicas do equipamento estão contidas no Quadro 5.

Quadro 5. Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fotobiomodulação.

PARÂMETROS	DMC <i>Therapy EC</i> [®] (Laser vermelho e infravermelho)
Potência útil	100 mW ± 10%
Comprimento de onda	<i>InGaAl</i> 660 ± 10 nm <i>AsGaAl</i> 808 ± 10nm
Tempo de irradiação/ponto	10s
Dose/ponto	1 J/cm ²
Modo de emissão	Contínuo
Diâmetro do feixe	0,0984 cm ²

Fonte: Autor.

3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o período experimental de cada subgrupo, os animais seguiram para eutanásia, através da injeção de Ketamina 10% na dose de 300mg.kg⁻¹ + adrenorreceptores alfa-2 e Xilazina 2% na dose de 30mg. kg⁻¹ por via intraperitoneal. A morte foi constatada por dois avaliadores previamente calibrados por meio da ausência de movimentos respiratórios, ausência de batimentos cardíacos, mucosas pálidas e perda de reflexo corneal. Realizada a eutanásia, foi realizada a remoção dos espécimes para análises histopatológicas e os animais foram recolhidos por uma empresa especializada e encaminhados para incineração.

3.10 AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS

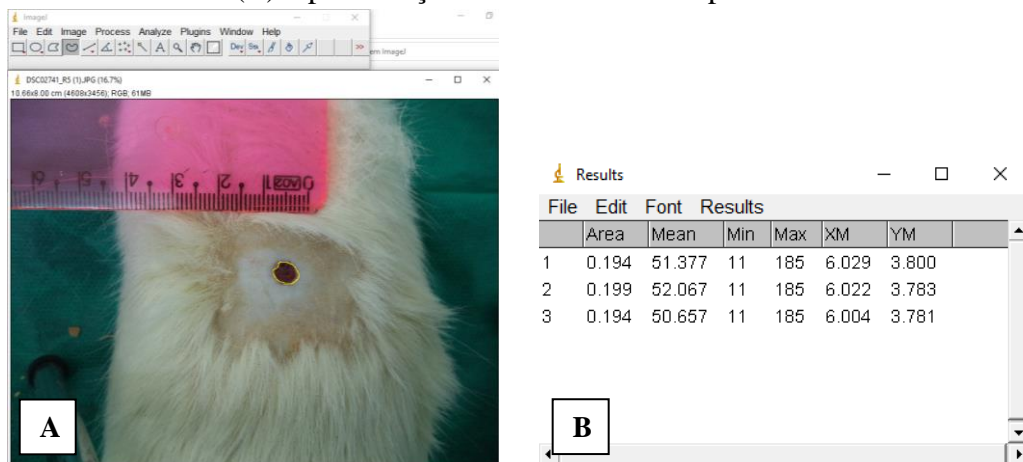
Para a avaliação do Índice de Retração da Ferida (IRF) foi utilizada a metodologia de Fernandes Neto *et al.* (2019), As imagens foram analisadas no programa gratuito Image J versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Depois de transferir a fotografia para o programa, realizou-se a mensuração da distância de 1cm na régua, para a escolha da

escala em centímetros, por meio da ferramenta Straight line selection e a opção Set scale na guia Analyze. Logo após, a ferida foi detalhadamente contornada por uma única avaliadora e de forma cega, através da ferramenta Freehand selections. Feito isso, o programa calculou a área de interesse, por meio da ferramenta Measure, na guia Analyze. O IRF foi calculado pela fórmula matemática:

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

Foi estabelecida a média por grupo de tratamento e os dados obtidos, anotados em ficha apropriada para esta avaliação (APÊNDICE B).

Figura 4. (A) Mensuração da área exata da ferida através do programa *Image J* versão 1.50i. (B) Apresentação das medidas em triplicata.

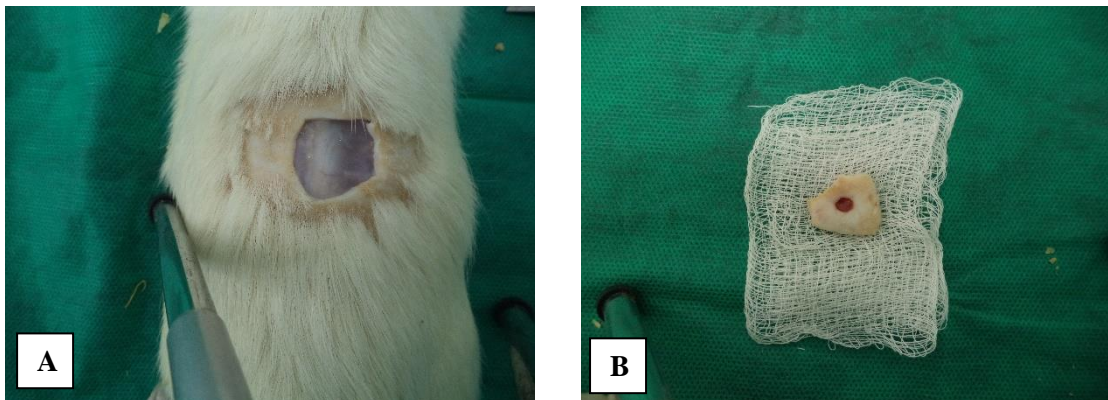


Fonte: Autor.

3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A partir do material embocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3µm de espessura. Os referidos cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos métodos de coloração histoquímica descritos abaixo, de acordo com os protocolos estabelecidos no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB – Campus I. Cortes histológicos corados em Hematoxilina e eosina foram utilizados para as análises de reepitelização da ferida e do infiltrado inflamatório. Por sua vez, a coloração com azul de toluidina foi utilizada para a avaliação e quantificação dos mastócitos.

Figura 5. (A) Remoção do espécime. (B) Espécime removido com gaze estéril.



Fonte: Autor.

3.11.1 Reepitelização e infiltrado inflamatório

A reepitelização foi avaliada de forma semi-quantitativa de 0 a 4: (0= ausência; 1= presente, cobrindo <50% da ferida; 2 = presente, cobrindo >50% da ferida; 3= presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido irregular; 4= presente, cobrindo 100% da ferida, com tecido regular) (MEIRELES *et al.*, 2008).

A contagem de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) foi mensurada pela contagem das células em 10 campos da área da ferida ($\times 1000$) por espécime, de forma cega e por uma única avaliadora previamente calibrada, de acordo com a metodologia adaptada de Medeiros *et al.* (2017). Após a realização das fotomicrografias, as células foram contabilizadas com auxílio do programa gratuito *Image J* versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

- **Hematoxilina-Eosina (HE)**

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);

⇒ Reidratação 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);

⇒ Coloração com hematoxilina de Harris (5 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (5 minutos);

- ⇒ Coloração com eosina de Lison (4 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 (5 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

3.11.2 Identificação e quantificação de mastócitos

As lâminas coradas com azul de toluidina foram escaneadas (x 400 de ampliação) com auxílio do equipamento *Scanner Aperio CS2 System* (*Leica Biosystems Imaging*, IL, USA) e as imagens transferidas para o *software Aperio ImageScope 12.4.3.5008* (*Leica Biosystems Pathology Imaging*, IL, USA). Foram contabilizados os mastócitos em toda a área viável da lesão, utilizando a ferramenta *Counter Tool* e de acordo com a metodologia adaptada de Bagheri *et al.* (2018). O grau de degranulação nas células permite a identificação de três tipos de mastócitos: Mastócitos Tipo 1 (MCT1), mastócitos intactos; Mastócitos Tipo 2 (MCT2), mastócitos com grânulos liberados, porém, com borda celular intacta; e Mastócitos Tipo 3 (MCT3), mastócitos com enorme degranulação e desintegração parcial ou completa da borda celular.

Foi contabilizada a quantidade de cada tipo e o número total de mastócitos para cada animal. A contagem foi realizada de forma cega, por uma única avaliadora previamente calibrada, e todos os dados foram anotados em uma ficha específica. Em sequência, será estabelecido o número médio de vasos para cada animal.

- **Azul de Toluidina (AT)**

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (tempo de 15 minutos cada);
- ⇒ Hidratação em água destilada (1 minuto);
- ⇒ Coloração com solução de azul de toluidina (0,1g de azul de toluidina + 100ml de água destilada) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água destilada: 5 minutos;
- ⇒ Três banhos em álcool etílico absoluto: 8 mergulhos em cada álcool;

- ⇒ Três passagens em xilol: 10 mergulhos em cada xilol;
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi utilizado o programa IBM® SPSS Statistics (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O IRF, infiltrado inflamatório e os dados referentes à quantidade de mastócitos, 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% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta dissertação:

Ação da fotobiomodulação na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção: análise clínica e histológica

O referido artigo será submetido ao periódico *Lasers in Medical Science* (Qualis Odontologia A2/ Fator de impacto: 3.161).

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Ação da fotobiomodulação na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção: análise clínica e histológica

Laís Gonzaga de Farias¹, Thamyres Maria Silva Simões¹, Carlos Augusto Barboza Galvão², Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil

² Departamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil

Autor para correspondência: Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

Endereço de e-mail: mhelenact@zipmail.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos fotobiomoduladores do laser de baixa intensidade (LBI) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos. Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, machos, divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (CTR) (n=15); (VERM) (n=15); (INFRA) (n=15) e (COMB) (n=15), com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (3, 7 e 14 dias). Grupo Controle = tratamento

simulado com aparelho desligado. Grupo Vermelho =Aplicação do laser vermelho ($660 \pm 10\text{nm}$, 100 mW) foi realizada em quatro pontos equidistantes e um ponto central); Grupo Infravermelho = aplicação do laser infravermelho em seu respectivo grupo ($808 \pm 10\text{nm}$, 100 mW) e Grupo Combinado = aplicação simultânea do laser vermelho e infravermelho seguindo o mesmo protocolo ($660 \pm 10\text{nm} + 808 \pm 10\text{nm}$; 100 mW). Foram realizadas avaliações macroscópicas e Índice de Retração da Ferida (IRF). Cortes histológicos foram submetidos à hematoxilina-eosina e azul de toluidina para a análise quantitativa de neutrófilos, linfócitos e mastócitos. Observou-se que o IRF nos grupos tratados foi maior em comparação ao não tratado. O grau de reepitalização foi completo (escore 4) em todos os grupos tratados, aos 14 dias. Também aos 14 dias houve diminuição do infiltrado inflamatório, principalmente nos grupos COMB e INFRA. Também foi constatada a diminuição de mastócitos tipo 2 e aumento de mastócitos tipo 3 ao término do período final das análises. Este estudo sugere que a fotobiomodulação, na dosimetria utilizada, contribuiu para a cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção, estimulando os estágios iniciais de reepitelização, melhora da resposta inflamatória e possíveis efeitos analgésicos.

Palavras-chave: Ferida; Cicatrização; Laser; Ratos.

Introdução

As feridas podem ser definidas como lesões traumáticas localizadas em tecidos do corpo sendo causadas principalmente por fatores como fricção, calor, radiação, contato de produtos químicos e eletricidade. Como exemplos de feridas, pode-se citar as queimaduras, lesões por pressão e feridas cirúrgicas que muitas vezes podem culminar em necroses teciduais, aumento no nível de sintomatologia dolorosa e incapacidade [1,2].

Uma vez que a lesão é formada, a pele possui dois mecanismos a fim de reparação tissular, que são a regeneração e a cicatrização. A regeneração é caracterizada pela substituição de tecido lesionado através de um processo inflamatório agudo que aproxima as bordas epiteliais em direção à região central da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície, permanecendo íntegra a camada basal do epitélio [3].

A cicatrização pode ser classificada em dois tipos básicos: por primeira intenção, quando há uma pequena perda de tecido, não havendo impedimento para que as bordas teciduais sejam aproximadas mecanicamente; e por segunda intenção, existindo uma considerável perda tecidual, impossibilitando que as bordas da lesão sejam aproximadas de forma mecânica [4].

Uma cascata de processos é necessária para que haja a cicatrização dessas feridas, sendo esta, coordenada por eventos celulares e moleculares que se interrelacionam para efetiva reconstituição tecidual. Esses processos se desenvolvem ao longo de três períodos sobrepostos: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a de maturação. Diversos fatores podem contribuir para que esses fatos ocorram de forma insatisfatória, ou até mesmo, não ocorram, como a presença de doenças sistêmicas, doenças crônicas, desnutrição, idade, insuficiência renal e diabetes mellitus [5].

Alguns métodos como fármacos, materiais e terapias de reparo são estudados a fim de melhorias nos quadros de reparação tecidual em seres vivos. A terapia de fotobiomodulação com laser de baixa intensidade (LBI) é utilizada como relevante recurso para aliviar a sintomatologia dolorosa, devido seus efeitos anti-inflamatórios e empregada também para acelerar o processo de cicatrização em casos de lesão muscular, úlceras e queimaduras [6,7].

Nesse sentido, estudos *in vivo* voltados à utilização da fotobiomodulação com o laser de baixa potência na cicatrização de feridas se intensificam e têm demonstrado resultados importantes na neoangiogênese, estímulo da síntese e deposição de colágeno, aumento da quantidade de fibroblastos e contração da ferida [8-13].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção em pele de ratos, através de parâmetros clínicos e histológicos.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 60 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 10 semanas de vida e peso entre 200-250 gramas provenientes do centro de bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba. Foram alojados em gaiolas de 1500 cm², do tipo microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar, alojados nestes compartimentos somente três (03) indivíduos, em função do peso ou da idade e a forração das mesmas foi realizada com maravalhas de *Pinus* esterilizada por radiação gama. Os animais receberam água *ad libitum*, ração padronizada, sob temperatura padronizada entre 23°C ± 1°C e iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro).

Foram excluídos os animais que apresentaram qualquer manifestação de doença local ou sistêmica. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob número de aprovação 003/2020.

Grupos Experimentais

Os 60 animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo controle (CTR) (n=15), grupo vermelho (VERM) (n=15), grupo infravermelho (INFRA) (n=15) e grupo combinado (COMB) (n=15). Com subgrupos de 5 ratos para cada tempo de eutanásia (3, 7 e 14 dias).

Método Experimental

Os animais foram anestesiados previamente ao ato cirúrgico com aplicação intraperitoneal de solução de 100mg/kg de ketamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, BR) e 5 mg/kg de Xilazina 10% (Dopaser®, Hertape, Juatuba, MG, BR). Após atingir o plano anestésico profundo, foi realizada a tricotomia do dorso, através do uso de lâmina de barbear adaptada em porta agulha cirúrgico, associado à água com digluconato de clorexina a 0,5% (Rioehx® 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, BR).

Anteriormente à confecção da ferida, foi realizada a antisepsia tópica no dorso dos animais utilizando gaze estéril embebida em digluconato de clorexina 2% (Solução de Clorexina 2%, Maquira® Indústria de produtos odontológicos, LTDA, Maringá, PR, BR). Foi confeccionada no dorso do animal uma ferida cirúrgica com um *punch* de 6 mm de diâmetro. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado por uma única operadora calibrada. Após a indução da ferida foi realizada uma pressão com gaze estéril e soro fisiológico durante dois minutos, a fim de se evitar sangramento.

Laserterapia

Foi utilizado como fonte de luz para esse estudo o laser de baixa intensidade *Therapy EC*® (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos – SP, Brasil). O laser foi aplicado de forma contínua, de acordo com o protocolo de irradiação: Grupo CTRL (Controle): simulação de tratamento com aparelho desligado; Grupo VERM (Laser Vermelho): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=660$

nm \pm 10 nm, 100 mW, 50s); Grupo INFRA (Laser Infravermelho): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=808\text{nm} \pm 10 \text{ nm}$, 100 mW; 50s); Grupo COMB (Laser Vermelho e Laser Infravermelho aplicados simultaneamente): de forma pontual, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida e um ponto central ($\lambda=660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm} + \lambda= 808 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$; 100 mW; 50s).

Eutanásia e Índice de Retração da Ferida

Após o período experimental de cada subgrupo, os animais seguiram para eutanásia, através da injeção de Ketamina 10% na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + adrenorreceptores alfa-2 e Xilazina 2% na dose de $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via intraperitoneal. Para a avaliação da retração da ferida, todas as lesões foram fotografadas com câmera digital, a uma altura de 15 cm da lesão, e analisadas no programa Image J versão 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). O IRF foi calculado pela fórmula: $\text{IRF} (\%) = (\text{área inicial} - \text{área do dia da eutanásia}) \div \text{área inicial} \times 100$. As mensurações foram realizadas em triplicata por uma mesma avaliadora calibrada e de forma cega.

Processamento Histológico

Constatada a morte do animal, realizou-se a remoção do espécime com bisturi e tesouras estéreis. Após fixação em formol a 10%, a amostra foi incluída em parafina e submetida a cortes de 3 μm de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos a métodos rotineiros de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT).

Avaliação Morfológica

O grau de reepitelização das feridas seguiu os critérios adotados por Meireles et al. [14] (tabela 1). A contagem de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) foi mensurada pela contagem das células em 10 campos da área da ferida ($\times 1000$) por espécime, de forma cega de acordo com a metodologia adaptada de Medeiros et al. [15].

As lâminas coradas com azul de toluidina foram escaneadas ($\times 400$ de ampliação) com auxílio do equipamento *Scanner Aperio CS2 System (Leica Biosystems Imaging, IL, USA)* e as

imagens transferidas para o *software Aperio ImageScope 12.4.3.5008 (Leica Biosystems Pathology Imaging, IL, USA)*. Foram identificados e contabilizados os mastócitos em toda a área viável da lesão (em campos superficiais e profundos), utilizando a ferramenta *Counter Tool* e de acordo com a metodologia adaptada de Bagheri et al [16], a contagem foi realizada de forma cega, por uma única avaliadora previamente calibrada.

Análise Estatística

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

Resultados

Índice de Retração da Ferida

Dentre os resultados obtidos para as amostras realizadas em 3 dias, as conferências realizadas entre os grupos que obtiveram resultados significativos estatisticamente foram: Combinado x Controle; Vermelho x Controle; Infravermelho x Controle. Destes resultados, as feridas dos grupos combinado (mediana 30%; variação 38,63 a 9,87) versus controle (mediana -24%; variação 9,38 a -65,91) ($p=0,09$) obtiveram maiores índices de retração de feridas, assim como ocorrido entre os grupos vermelho (mediana 21,00%; variação 32,70 a -8,17) versus controle (mediana -24%; variação 9,38 a -65,91) ($p=0,027$) e infravermelho (mediana 29%; variação 41,7 a 11,18) versus controle (mediana -24%; variação 9,38 a -65,91) ($p=0,09$).

Em 7 dias, a conferência realizada entre os grupos que obteve resultado significativo estatisticamente foi verificada apenas entre Combinado (mediana 29%; variação 51,08-12,07) e Vermelho (mediana 38%; variação 59,72-49,22) ($p=0,028$).

No último período, 14 dias, houveram resultados estatisticamente significativos entre os grupos: Combinado x Controle; Vermelho x Controle; Infravermelho x Controle e Infravermelho x Vermelho. Dentre os comparativos dos grupos citados, foram: Combinado (mediana 9%; variação 88,48-76,10) e Controle (mediana 28%; variação 91,57-49,45)

($p=0,09$); Vermelho (mediana 29%, variação 87,36-81,17) e Controle (mediana 28%; variação 91,57-49,45) ($p=0,09$); Infravermelho (mediana 18%; variação 91,57-85,28) e Controle (mediana 28%; variação 91,57-49,45) ($p=0,09$); Infravermelho (mediana 18%; variação 91,57-85,28) e Vermelho (mediana 29%, variação 87,36-81,17) ($p=0,047$).

No período de 14 dias ocorreram maiores retrações das feridas, quando comparado aos demais períodos estudados. Além disso, a variabilidade dos resultados para esse último tempo foi substancialmente mais constante que os demais.

Reepitelização

Após 3 da indução da ferida, observou-se escore 0 em 100% ($n=5$) dos casos do grupo CTRL; 100% ($n=5$) dos casos do grupo VERM; 100% ($n=5$) dos casos do grupo COMB e o mesmo resultado observado no grupo INFRA. No tempo de 7 dias, o escore 2 foi observado em 60% dos casos ($n=3$) do grupo CTR; escore 1 em 80% dos casos do grupo COMB ($n=4$); escore 1 em 60% ($n=3$) dos casos do grupo VERM e escore 1 em 40% dos casos ($n=2$) do grupo INFRA. Aos 14 dias, verificou-se reepitelização completa (escore 4) em 100% ($n=5$) dos animais dos grupos VERM, COMB e INFRA e reepitelização irregular (escore 3) em 80% ($n=4$) dos animais do CTRL.

Infiltrado Inflamatório

Dentre os resultados obtidos para as amostras realizadas no tempo de 3 dias, as conferências realizadas entre os grupos que obtiveram resultados significativos estatisticamente foram: Combinado x Infravermelho ($p=0,16$); Combinado x Vermelho ($p=0,27$).

Em 7 dias, a conferência realizada entre os grupos que obteve resultado significativo estatisticamente foi verificada apenas entre Combinado (mediana %; variação) e Controle (mediana %; variação) ($p=0,033$). No último período de 14 dias, houve resultados estatisticamente significativos entre os grupos: Combinado x Controle; Combinado x Infravermelho; Infravermelho x Vermelho e Combinado x Vermelho.

Aos 14 dias, foi constatada uma diminuição na quantidade de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) principalmente nos grupos COMB e INFRA (Tabela 1).

Mastócitos

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no período de três dias. No período de 7 dias foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Combinado e Controle nas médias de MCT2 ($p=0,21$) e MCTtotal ($p=0,59$). Grupos Infravermelho e Controle na média de MCT2 ($p=0,59$); Vermelho e Controle em MCT3 ($p=0,009$).

Em 14 dias os resultados estatisticamente significativos foram analisados nos grupos Infravermelho e Controle em MCT3 ($p=0,11$) e, Infravermelho x Vermelho também em MCT3 ($p=0,12$). Visualizam-se os resultados nas tabelas (Tabelas 2, 3 e 4).

Foram identificados e avaliados os mastócitos íntegros, em degranulação e degranulados nas regiões superficiais e profundas das feridas.

Discussão

A fotobiomodulação que inclui o uso do laser de baixa intensidade (LBI) e também o LED, tem sido considerada relevante pelos vários efeitos biológicos nos tecidos, principalmente por suas funções terapêuticas. Tais efeitos dependem da absorção de energia de uma radiação incidente (fotoreceptores) nas células que provocam repercussões fotofísicas e fotoquímicas a nível molecular e celular [17].

Estudos experimentais que avaliaram *in vivo* a eficácia da fotobiomodulação são presentes na literatura [9-13], efeitos importantes dessa técnica são relatados, como a atenuação no número de células inflamatórias [18] redução da área da ferida, aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno [19]. É relevante considerar que existe uma diversidade de protocolos adotados nas pesquisas com fotobiomodulação, o que pode ser um fator que dificulta a comparação de resultados.

Nos últimos anos, grandes avanços foram obtidos em relação aos tratamentos das feridas cutâneas cicatrizadas por segunda intenção. A necessidade desses tratamentos ainda é um desafio crescente, que exige estratégias em saúde inovadoras. Além disso, há um aumento nas evidências que os fibroblastos nas feridas crônicas são senescentes e que possuem uma capacidade migratória e proliferativa diminuída. Isso pode ser associado ao processo de reparo dessa ferida prejudicada e suas eventuais falhas de cura [18,19].

O tempo de retração da ferida, é um dos parâmetros iniciais de avaliação. Na prática, a comparação dos valores mensurados indica o possível sucesso ou insucesso da terapia, bem

como o tempo que o paciente pode permanecer exposto a uma série de complicações como infecções, dificuldades de cicatrização, perda de fluídos, entre outros [17-19].

No presente estudo, observou-se um fechamento mais efetivo da ferida nos grupos tratados (COMB, INFRA e VERM), apresentando uma taxa de retração da ferida ainda mais elevada no grupo INFRA em relação aos demais grupos, estando todas as feridas desse grupo fechadas ao 14º dia. Resultados semelhantes foram encontrados por [20, 11] em modelos experimentais *in vivo* utilizando a fotobiomodulação.

O grupo CTRL apresentou resultados satisfatórios em relação à cicatrização natural da ferida, mas o que pôde ser avaliado é que as feridas tratadas obtiveram retração ainda mais satisfatória.

Apesar da taxa de contração ser um parâmetro básico e sempre utilizado na avaliação de feridas cutâneas [21] o entendimento de como os tecidos se comportam com o uso de determinadas terapias durante o reparo tecidual permite entender quais os benefícios e malefícios das escolhas desses tratamentos [22].

O mecanismo de ação da luz laser vermelho e infravermelho, ou seja, da fotobiomodulação utilizada, atua nas mitocôndrias que podem promover modulações teciduais, agindo na cadeia respiratória reverberando no processo de cicatrização e proliferação celular [23].

A cicatrização de feridas é um processo intimamente orquestrado pelas fases de hemostasia, inflamação, remodelação e proliferação. Durante os estágios iniciais da ferida, existe um predomínio de células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos e macrófagos que são importantes na secreção da variedade de células regulatórias [24].

Na análise do infiltrado inflamatório desse estudo, que consistiu na identificação e contagem de neutrófilos e linfócitos, se apreendeu que houve uma atenuante diminuição na quantidade dessas células compreendendo o período total da pesquisa, de 3 a 14 dias. Durante os estágios iniciais de uma ferida, as células inflamatórias são importantes a fim de que se haja o debridamento da área, liberação de citocinas e fatores de crescimento. Existe, portanto, um pico de inflamação nos primeiros dias após a lesão [25].

Os resultados predominantemente significativos estatisticamente ocorreram principalmente aos 14 dias entre os grupos, onde o grupo COMB e INFRA ($p=0,03$) apresentaram significativa diminuição de células inflamatórias. Resultados similares foram obtidos por Castro et al. [26] ao avaliar os efeitos das luzes em comprimentos de onda semelhantes a este estudo, havendo decréscimo dessa inflamação principalmente nos grupos que receberam os tratamentos combinado e infravermelho.

É relevante compreender que a luz laser infravermelha apresenta características de maior penetração e maior espalhamento na profundidade, modulando os quadros de inflamação. Sendo assim, uma possível potencialização dos efeitos quando se agrega os lasers vermelho e infravermelho pode ser observada, em virtude principalmente deste último. Usando os parâmetros de lasers semelhantes [27], se observa uma tendência de melhoria nesses quadros inflamatórios nos grupos tratados, comparando-se aos não tratados.

Compreendendo a complexidade dos eventos celulares integrados na cicatrização das feridas, encontrar elementos que interajam em maior quantidade nestas circunstâncias tem se tornado fundamental para uma modulação integral no processo de cicatrização. Os mastócitos podem agregar de forma ampla e enfática nas cascatas que envolvem a resposta imune nas fases proliferativas e inflamatórias, assim como na transição dessas etapas [28].

Além de seu clássico papel nas funções alérgicas, os mastócitos contribuem para vários processos biológicos, incluindo a cicatrização das feridas. Aspectos importantes de sua distribuição histológica são relatados pois representam cerca de 8% de todas as células presentes na derme e, no início de uma lesão cutânea, acumulam-se e liberam mediadores pró inflamatórios e biomoduladores [28, 29].

No presente estudo, foram identificados e avaliados os mastócitos íntegros (MCT1), em degranulação (MCT2) e degranulados (MCT3) nas regiões superficiais e profundas das feridas. Compreendendo os achados se pode observar uma diminuição dos MCT1 ao término do período de 14 dias nos grupos COMB e VERM, havendo também decréscimo dos MCT2 nos grupos COMB e INFRA. Nos estudos de Bagheri et al. [16] e Ahmadi et al. [29] evidenciaram a diminuição da quantidade dessas células na cicatrização de feridas excisionais em ratos de estudos semelhantes a esta pesquisa.

É relevante ressaltar que os comprimentos de onda utilizados são importantes fatores a serem observados no que diz respeito às mudanças nos padrões de volume dos mastócitos. Kouhkehl et al. [30] buscaram avaliar o papel que a fotobiomodulação pode desempenhar nessas células na etapa de remodelação tecidual, os comprimentos de onda 660, 820, 940, e 950nm são citados como possíveis indicadores para a potencialização nos aumentos estatisticamente significativos do número de mastócitos [31-33].

Neste estudo foram usados os comprimentos de onda nos espectros 660 e 808 nm e houve aumento do número de mastócitos MCT3 ao término dos 14 dias de avaliação INFRA e CTRL ($p=0,11$); INFRA e VERM ($p=0,12$). À medida que os mastócitos degranulam, liberam um amplo espectro de mediadores ativos como histamina, serotonina e proteases, modulando o processo inflamatório [28].

Esse aumento dos MCT3 pode ser explicado em virtude tanto do espectro de irradiação, como da região mais detalhada das análises compreendendo campos superficiais e profundos da área da ferida. Entende-se dessa forma, os possíveis efeitos biológicos que a fotobiomodulação pode desempenhar nessas células.

Conclusão

Os achados deste estudo de acordo com o protocolo utilizado e períodos estudados, sugerem que a fotobiomodulação com a luz laser de forma combinada contribuiu de forma assertiva na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção. Baseado nestes resultados estudos futuros serão importantes para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos efeitos fotobiomoduladores desse tipo de luz na cicatrização dessas injúrias.

REFERÊNCIAS

1. Kyaw BM, Järbrink K, Martinengo L, Car J, Harding K, Schmidtchen, A (2018) Need for improved definition of “chronic wounds” in clinical studies. *Acta Derm Venereol* 1:152-158.
2. Rezaie FM, Moghaddam M, Meshkin H (2019) Regeneration and repair of skin wounds: various strategies for treatment the international journal of lower extremity wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 3:247-26.
3. Woessner E; Mcgee J D, Jones, J D, Quinn K (2019) Characterizing differences in the collagen fiber organization of skin wounds using quantitative polarized light imaging. *Wound repair regen* 6:711-714.
4. Mortozavi H, Baharvand M, Rahmanini S (2016) Diagnostic features of common oral ulcerative lesions: An updated decision tree. *Int J Dent* 3:257.
5. Shi C, Whang C, Liu H, Li Q, Li R, Zhang Y, Liu Y, Shao Y, Whang J (2020) Selection of appropriate wound dressing. *Front Biong Biotechnol* 8:182-188.
6. Lima FJC, De Oliveira Neto OB, Barbosa FT, Nascimento Galvão AM, Ramos FWS, De Lima CCF (2016) Is there a protocol in experimental skin wounds in rats using low-level diode laser therapy (LLDLT) combining or not red and infrared wavelengths? Systematic review. *Lasers Med Sci* 4:779–787.
7. Medeiros, ML (2017) Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci* 1:35-43.
8. 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
9. Suzuki R, Takakuda K (2016) Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. *Lasers Med Sci* 8:1683–1689.
10. Eissa M, Salih WHM (2017) The influence of low-intensity he-ne laser on the wound healing in diabetic rats, *Lasers Med Sci* 6:1261-1267.
11. Soleimani H, Amini A, Taheri S, Sajadi E, Shafikahani S, Shuger LA, Veddy BV, Ghoreishi SK, Pouriran R, Chien S, Bayat, M (2018) The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats, *J Photochem Photobiol B* 18: 23-30.

12. Amadio EM, Marcos RL, Serra AJ, Santos SA, Chaires JA, Fernandes GHC, Junior, ECL, Ferrari JCC, Carvalho PTC (2021) Effects of the photobiomodulation phase of treatment therapy and wound healing in a low-protein diet feeder, *Lasers Med Sci* 7:1427-1435.
13. Amini A, Soleimani H, Rezaie F, Ghoreish SK, Chien S, Bayat S (2021) The combined effect of the photobiomodulation and wound curcumin on acute wound healing in rats, *Lasers Med Sci* 3: 500- 510.
14. 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
15. Medeiros, ML (2017) Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci* 1:35-43.
16. Bagheri M, Amini A, Abdollahifar MA, Ghoreishi SK, Piryaei A, Pouriran R, Chien S, Dadras S, Rezaei F, Bayat M (2018) Effects of Photobiomodulation on degranulation and number of mast cells and wound strength in skin wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 10:1-9.
17. Lima AMCT, Sergio LPS, Foseca, AS (2019) Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. *Lasers Med Sci* 5:511- 518. doi: 10.1007/s10103-019-02879-1
18. Fiório FB, Silveira Júnior L, Munin E, Lima CJ, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA (2011) Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *J Cosmet Laser Ther* 13:315-322. doi: 10.3109/14764172.2011.63008
19. Neves SM, Nicolau RA, Filho AL, Mendes LM, Veloso AM (2014) Digital photogrammetry and histomorphometric assessment of the effect of non-coherent light (light-emitting diode) therapy (1640±20 nm) on the repair of third-degree burns in rats. *Lasers Med Sci* 29:203-212. doi: 10.1007/s10103-013-1312-7
20. Catão MHCV, Nonaka CFW, Albuquerque RLC, Bento PM, Costa, RO (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.
21. Magalhães MAB (2015) Closure of large wounds using rubber bands in rabbits. *Rev. Col. Bras. Cir* 1:56-61.
22. Han Y, Sun T, Han Y, Lin L, Liu C, Lia J, Yan G, Tao R (2019) Human umbilical cord mesenchymal stem cells implantation accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats via the Wnt signaling pathway. *Eur J Med Res* 8:10-24.

23. Ocon CA, Dos Santos SA, Caires JR et al (2019) Photomodulation effects and parameters in model: third-degree duration review experimental systematics. *Lasers Med Sci* 3:637–648. doi.org/10.1007/s10103-018-2633-3
24. Cotomacio CC, Campos L, Nesadal de Souza D, Arana-Chavez VE, Simoes A (2017) Dosimetric study of photobiomodulation therapy in 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *J Biomed Opt* 22: 180-186. doi.org/10.1117/1.JBO.22. 1.018003
25. Wang ZX, Kim SH (2020) Effect of Photobiomodulation Therapy (660 nm) on Wound Healing of Rat Skin Infected by *Staphylococcus*. *Photobio Photomed Laser Surg* 7: 419-424. doi: 10.1089/photob.2019.4754
26. Castro JR, Pereira FS, Chen L, Chavez VEA, Ballester RY, Dipietro LA, Simões A (2020) Improvement of full-thickness rat skin wounds by photobiomodulation therapy (PBMT): A dosimetric study. *Journ of photochemistry & photob* 206:111-118.
27. Hendler KG, Canever JB, Sousa LB, Neves LMS, Fonseca MCR, Kuriki HU, Junior ASA, Barbosa RI, Marcolino AM (2021) Comparison of photobiomodulation in the treatment of skin injury with an open wound in mice. *Lasers Med Sci* 9: 1845-1854
28. Komi DEA, Khomtchouk K, Maria PLS (2019) A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical Rev in Allergy & Immunology* 1:23–28
29. Ahmadi H, Bayat M, Amini A, Mostafavinia A, Malekshah A, Gasor R, Asadi R, Gachkar L, Rezaei F, Shafikhani SH, Ghoreishi SK, Chien S (2022) Impact of preconditioned diabetic stem cells and photobiomodulation on quantity and degranulation of mast cells in a delayed healing wound simulation in type one diabetic rats. *Lasers In Medical Science* 3: 1594-1604.
30. Kouhkeheil R, Fridoni M, Abdollahifar MA, Amini A, Bayat S, Ghoreishi SK, Chien S, Kazemi M, Bayat M (2019) Impact of Photobiomodulation and Condition Medium on Mast Cell Counts, Degranulation, and Wound Strength in Infected Skin Wound Healing of Diabetic Rats. *Photobio Photomedicine, and Laser Surgery* 1: 1-9.
31. Maligieri LAZ, Neves LMG, Morais DT, Domingues RF, ARO AA, Pimentel ER, Amaral MER, Esquisatto MAM, Santos GMT, Mendonça FAS (2017) Differing energy densities with laser 670nm InGaP controls inflammation and collagen reorganization in burns. *Burns* 2:49-56. doi.org/10.1016/j.burns.2017.04.008.
32. Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho R (2011) Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 3: 125-131

Tabela 1. Número de células inflamatórias em todos os grupos

Grupo	Dias	Mediana	Mínimo	Máximo
Neutrófilos e Linfócitos				
Verm.	3	2,45	1,10	3,90
	7	2,50	1,60	4,80
	14	2,10	1,50	3,00
Infra.	3	2,50	2,30	3,40
	7	1,70	1,40	2,90
	14	0,60	0,50	1,50
Comb.	3	4,30	3,30	7,90
	7	1,60	0,70	2,50
	14	0,20	0,10	0,60
Ctrl.	3	3,00	1,80	5,10
	7	2,50	2,30	2,70
	14	1,50	1,30	2,70

Fonte: Autor.

Tabela 2. Número de mastócitos tipo 1 em todos os grupos

Grupo	Dias	Mediana	Mínimo	Máximo
Mastócitos Tipo 1				
Verm.	3	0,75	0,10	2,50
	7	1,80	0,70	2,60
	14	1,30	0,70	2,00
Infra.	3	1,90	0,70	3,70
	7	0,80	0,50	1,60
	14	2,00	0,90	2,40
Comb.	3	1,20	0,80	3,60
	7	1,60	0,10	2,10
	14	0,80	0,40	2,80
Ctrl.	3	1,60	0,50	1,80
	7	0,70	0,10	0,90
	14	1,30	1,00	2,20

Fonte: Autor.

Tabela 3. Número de mastócitos tipo 2 em todos os grupos

Grupo	Dias	Mediana	Mínimo	Máximo
Mastócitos Tipo 2				
Verm.	3	2,20	1,50	3,10
	7	1,90	0,40	2,90
	14	2,30	1,40	3,30
Infra.	3	0,90	0,70	2,70
	7	2,30	1,70	2,80
	14	1,90	1,40	2,30
Comb.	3	2,50	1,70	3,40
	7	2,50	2,10	3,30
	14	2,20	1,50	2,80
Ctrl.	3	2,10	1,60	2,90
	7	1,60	0,70	2,30
	14	1,90	1,30	2,10

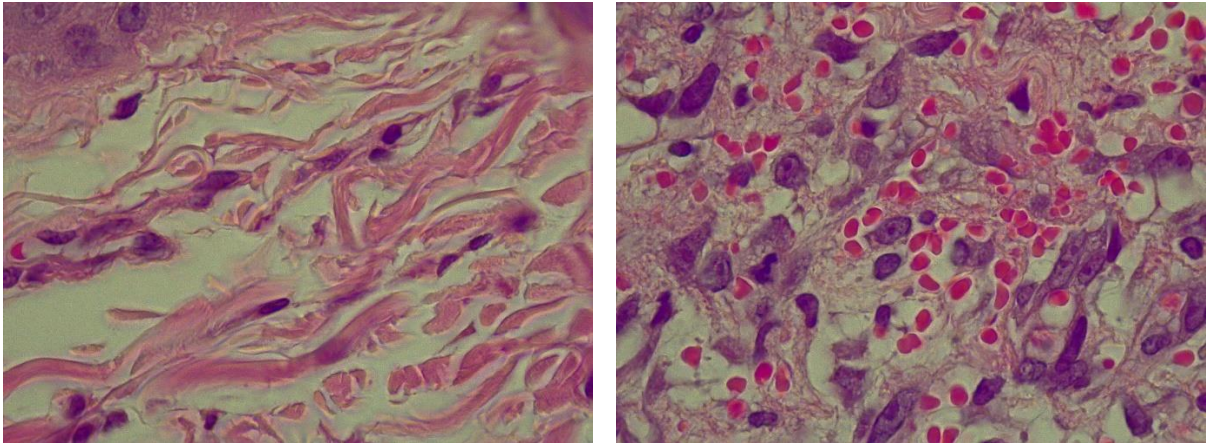
Fonte: Autor.

Tabela 4. Número de mastócitos tipo 3 em todos os grupos

Grupo	Dias	Mediana	Mínimo	Máximo
Mastócitos Tipo 3				
Verm.	3	0,80	0,50	1,00
	7	1,00	0,90	1,50
	14	1,90	1,40	2,60
Infra.	3	1,10	0,00	1,60
	7	1,80	0,70	2,30
	14	1,20	1,00	1,40
Comb.	3	0,60	0,20	1,20
	7	1,10	0,30	2,80
	14	1,80	0,90	2,40
Ctrl.	3	1,00	0,10	1,70
	7	1,90	1,70	2,90
	14	1,80	1,40	3,30

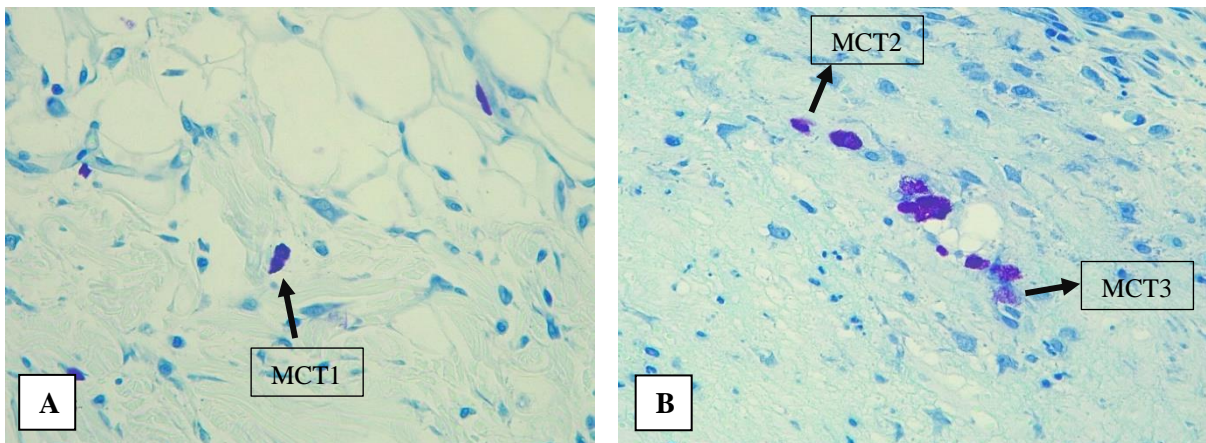
Fonte: Autor.

Fig 1. Avaliação histológica para contagem de neutrófilos e linfócitos (HE; x1000).



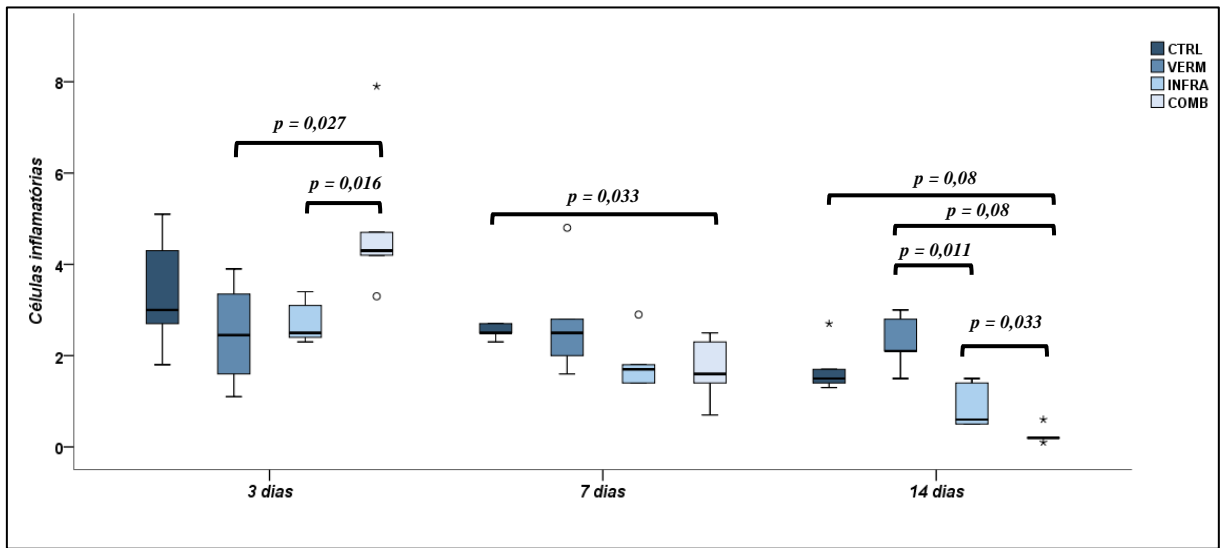
Fonte: Autor.

Fig 2. Identificação dos tipos de mastócitos para contagem (campos superficial e profundo)
(A) Campo superficial. (B) Campo profundo. (HE; x 400)



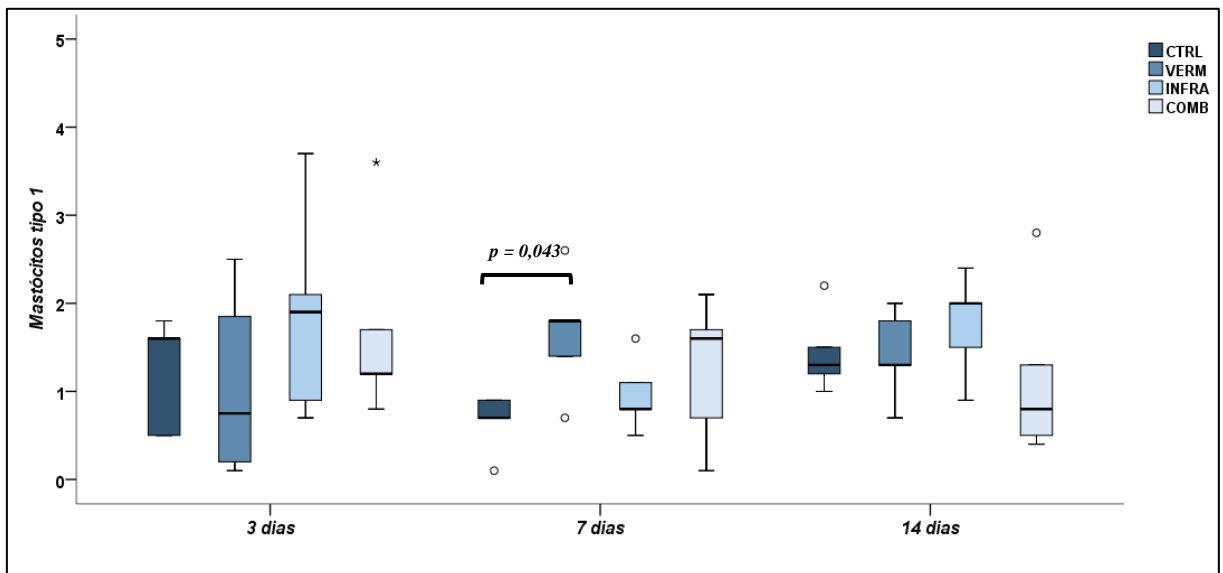
Fonte: Autor.

Fig 3. Gráfico *box-plot* ilustrando a quantidade de células inflamatórias nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).



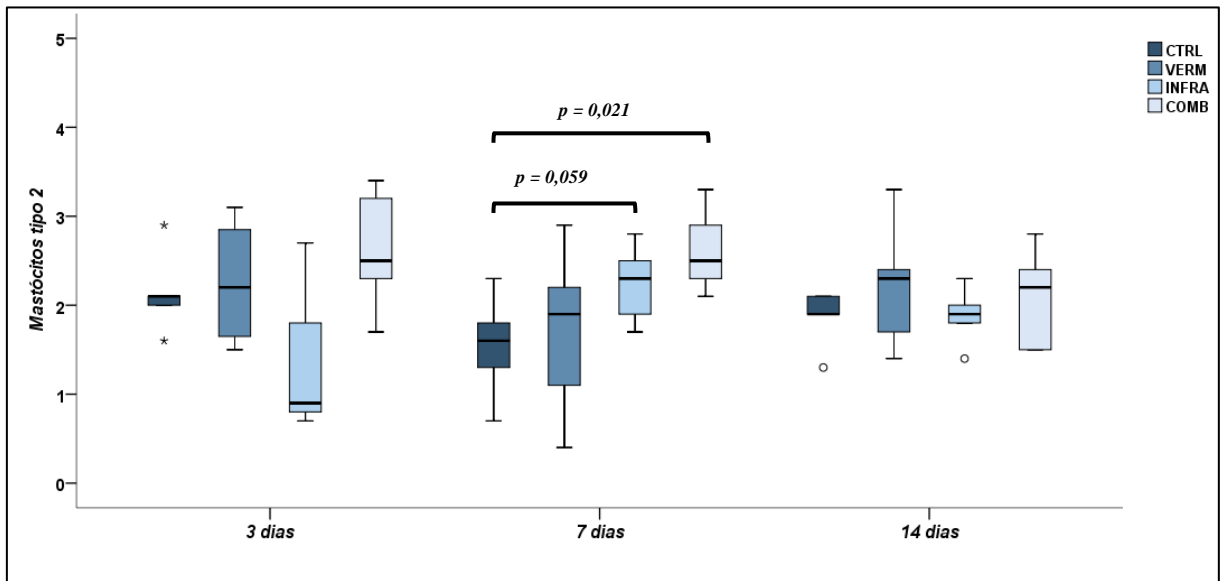
Fonte: Autor.

Fig 4. Gráfico *box-plot* ilustrando a quantidade de mastócitos tipo 1 nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).



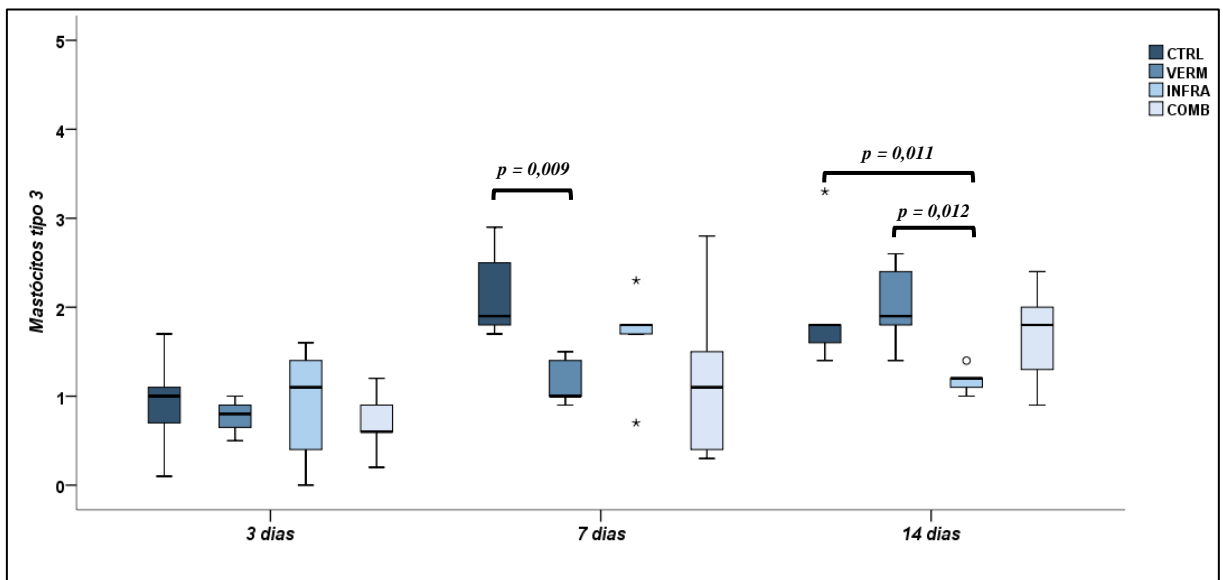
Fonte: Autor.

Fig 5. Gráfico *box-plot* ilustrando a quantidade de mastócitos tipo 2 nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).



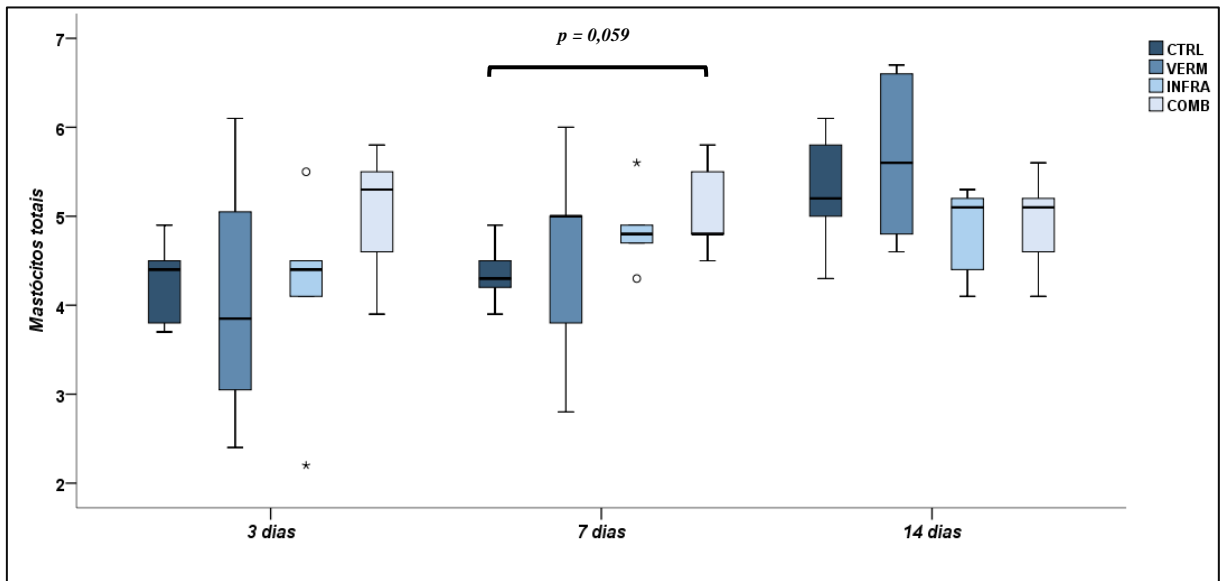
Fonte: Autor.

Fig 6. Gráfico *box-plot* ilustrando a quantidade de mastócitos tipo 3 nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).



Fonte: Autor.

Fig 7. Gráfico *box-plot* ilustrando a quantidade de mastócitos totais nos grupos experimentais em diferentes tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias).



Fonte: Autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados deste estudo, sugere-se que a fotobiomodulação nas dosimetrias e protocolos utilizados, pode estimular atividades importantes do processo de cicatrização, acompanhadas de possíveis efeitos analgésicos.

Considerando as limitações das técnicas histoquímicas e análises utilizadas, sugere-se que futuros estudos sejam desenvolvidos, a fim de avaliar com maior minuciosidade as tendências reveladas nesta pesquisa e compreender melhor os efeitos fotobiomodulares da luz laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção.

Destaca-se que com os resultados observados neste estudo, somados a carência de pesquisas que utilizam esses parâmetros, a presente pesquisa abre um campo que merece destaque e futuras investigações.

REFERÊNCIAS

AMADIO E.M. *et al.* Efeitos da terapia de fotobiomodulação na fase de proliferação de e cicatrização de feridas cutâneas em ratos alimentados com dieta hipoprotéica. **Lasers Med Sci**, v.37, n.7, p.1427-1435, 2021.

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. **Journals e books**, v.41, n.1, p.125-131, 2015.

AMINI, A. *et al.* O efeito combinado da fotobiomodulação e curcumina em feridas na cicatrização aguda de feridas cutâneas em ratos. **Lasers Med Sci**, v.12, n.3, p.500- 510, 2021.

ASGHARI, M. *et al.* The effect of combined photobiomodulation and metformin on open skin wound healing in a non-genetic model of type II diabetes. **J Photochem Photobiol B**, v. 169, n.2, p.63-69, 2017.

AVCI, P. *et al.* Lowlevel laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg**, v.32, n.13, p.41-52, 2013.

BANO, I. *et al.* Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **Int J Biol Macromol**, v.102, n.1, p. 380-383, 2017.

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.

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

CAPON, A. *et al.* Scar prevention using laser-assisted skin healing (lash) in plastic surgery. **Aesthetic Plastic Surgery**, v.34, p.438-446, 2010.

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.

CAMPOS, L. *et al.* Phototherapy with LED as an effective treatment for chemotherapy-induced oral mucositis in hamsters. **Lasers Med Sci**, v.11, n.4, p.475-480, 2020.

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.

CALISTO, F.C.F.S. *et al.* Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.30, n.3, p.100-110, 2015.

CAPON, A. *et al.* Scar prevention using laser-assisted skin healing (lash) in plastic surgery. **Esthetic Plastic Surgery**, v.34, n.2, p.438-446, 2010.

CHUNG, H. *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**, v.40, n.2, p. 516-526, 2012.

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

DARBY, I.A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v.7, n.2, p.301-311, 2014.

FARIAS, L.G.; CATÃO, M.H.C. Use of low intensity laser and LED in the wound healing process: review. **Research, society and dev**, v.11, n.4, p.100-108, 2022.

EISSA, M.; SALIH, W.H.M. The influence of low-intensity he-ne laser on the wound healing in diabetic rats. **Lasers Med Sci**, v.32, n.6, p.1261-1267, 2017.

FERNANDES NETO, J.A.; NONAKA, C.F.W.; CATÃO, M.H.C.V. Effect of blue LED on the healing process of third-degree skin burns: clinical and histological evaluation. **Lasers Med Sci**, v.34, n.4, p.721-728, 2019.

FREITAS L.F.; HAMBLIN M.R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **J Sel Top Quantum Electron**, v.2, n.4, 2016.

FEKRAZAD, R. *et al.* Effect of Laser Photostimulation on the healing of third-degree burn wounds in rats. **J Arch Mil Med**, v.2, n.3, p. 223-230, 2017.

GINESTAL, R. *et al.* Comparing the influence of two immunosuppressants (fingolimod, azathioprine) on wound healing in a rat model of primary and secondary intention wound closure. **Wound repair Regen**, v.27, n.1, p.59-68, 2019.

GLIM, J. E. *et al.* Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? **Wound Repair Regen**, v.21, n.5, p.648-660, 2013.

HADIS M.A. *et al.* Development and application of LED arrays for use in phototherapy research. **J Biophotonics**, v.1, n.3, p.1-12, 2017.

HASHEMI S.A.; MADANI S.A.; ABEDIANKENARI S. The review on properties of aloe vera in healing of cutaneous wounds. **Biomed Res Int**, v.7, n.14, p.216, 2015.

KUFFER, D. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Regenerative medicine**, v.11, n.1, p.100-116, 2016.

KYAW, B.M. *et al.* Need for improved definition of “chronic wounds” in clinical studies. **Acta Derm Venereol**, v.98, n.1, p.157-168, 2018.

LIMA, F.J.C. *et al.* Is there a protocol in experimental skin wounds in rats using low-level diode laser therapy (LLDLT) combining or not red and infrared wavelengths? Systematic review. **Lasers Med Sci**, v.31, n.4, p.779-787, 2016.

MEDEIROS, M.L. 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.

MEIRELLES, G.C.S. **Análise comparativa do efeito dos lasers GaAlAs de 660nm 780 + 810 nm na cicatrização de úlceras por queimaduras em dorso de ratos diabéticos e não – diabéticos: estudo histológico** (Tese de Doutorado). Salvador: Faculdade de Odontologia, UFBA, 2008.

MORTOZAVI, H.; BAHARVAND M.; RAHMANINI, S. Diagnostic features of common oral ulcerative lesions: An updated decision tree. **Int J Dent**, v.1, n. 3, p.257, 2016.

OLCZYK, P.; MENCNER L.; KOMOSINSKA-VASSEV K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **Biomed Res Int**, v.214, n.2, p.1-8, 2014.

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.

OYEBODE, O.A.; HOURED, N.N. A comparison between photobiomodulation at 830 nm and 660 nm on differentiation in diabetic human skin fibroblast cells. **SA Institute of Physics**, v.2, n.1, p.253-258, 2021.

PAKYARI, M. *et al.* Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. **Adv Wound Care**, v.2, n.5, p.215-224, 2013.

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

REZAIIE, F.M. *et al.* Regeneration and repair of skin wounds: various strategies for treatment the international journal of lower extremity wounds. **Int J Low Extrem Wounds**, v.18, n.3, p. 247-26, 2019.

ROBBINS, S.L.; CONTRAN, R.S. Fundamentos de Patologia. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.58, 2012.

ROCHA, C.L.J.V. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in NOD mice cutaneous wound by low-level laser therapy. **J Vasc Bras**, v.11, n.1, p.175-181, 2012. doi: 10.1590/S1677-54492012000300002.

SANTOS, A.T. *et al.* Screening for second intention of cutaneous wounds in rats Wistar with use of *Stryphnodendron adstringens*. **Cien. Animal**, v.29, n.1, p.15-29, 2020.

SARANDY, M.M. *et al.* *Strychnos pseudoquina* modulates the morphological reorganization of the scar tissue of second intention cutaneous wounds in rats. **Plos One**, v.13, n.4, p.120-125, 2018.

SHI, C. *et al.* Selection of appropriate wound dressing. **Front Biong Biotechnol**, v.19, n.8, p. 182, 2020.

SILVA, V.D.U *et al.* Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. **Lasers Med Sci**, v.31, n.7, p.1363-870, 2016.

SIMÕES, I.G. *et al.* Analysis of the influence of surface treatment by high-power laser irradiation on the surface properties of titanium dental implants: A systematic review. **Journals & book**, v.2, n.1, p.100-105, 2021.

SOLEIMANI, H. *et al.* The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats. **J Photochem Photobiol B**, v.18, n.1, p.23-30, 2018.

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

SORG, H. *et al.* Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. **Eur Surg Res**, v.58, n.1-2, p.81-94, 2012.

SUZUKI R.; TAKAKUDA K. Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. **Lasers Med Sci**, v.31, n.8, p.1683-1689, 2016.

TABAKOGLU, H.O.; TOPALOGLU, N.; GULSOY, M. The effect of irradiance level in 980-nm diode laser skin welding. **Photomed and Laser Surgery**, v.28, n.4, p.453-458, 2010.

TRAJANO, E.T.L. *et al.* Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers Med Sci**, v.30, n.3, p.1297-1304, 2015.

YADAV, A.; GUPTA, A. Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.33, n.2, p.4-13, 2017.

WOESSNER, A.E.; MCGEE, J.D.; JONES, J.D. Characterizing differences in the collagen fiber organization of skin wounds using quantitative polarized light imaging. **Wound repair regen**, v.27, n.6, p.711-714, 2019.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS (CEUA)

**Universidade Estadual da Paraíba**

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUACampus I – Campina Grande - PB.
e-mail: ceuauepb@gmail.com**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DA TERAPIA DE FOTBIOMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS: ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, que envolve o uso de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 5 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual da Paraíba, em reunião de 15/12/2020, com protocolo de aprovação número **003/2020**.

Vigência da Proposta: de 02/2021 a 01/2022
Procedência dos animais: Centro de Bioterismo da UEPB
Espécie: Rattus norvegicus
Linhagem: Wistar
Sexo: Machos
Idade: 10 semanas
Número de animais autorizados: 60 (Sessenta)

Informação ao pesquisador:

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA-UEPB o **Relatório Final** baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. **O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 01/2022.**

Campina Grande, 27 de janeiro de 2021

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais/UEPB

*ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS PARA O PERÍODICO 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* 965:325–329

- 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 reuse 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.