



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO**

RHUAN ISLLAN DOS SANTOS GONÇALVES

**ANÁLISE DOS MASTÓCITOS A FOTOBIMODULAÇÃO COM DIODO
EMISSOR DE LUZ (*LED*) VERDE E VERMELHO EM QUEIMADURAS
CUTÂNEAS DE TERCEIRO GRAU**

**CAMPINA GRANDE – PB
2023**

RHUAN ISLLAN DOS SANTOS GONÇALVES

**ANÁLISE DOS MASTÓCITOS A FOTOBIMODULAÇÃO COM DIODO
EMISSOR DE LUZ (*LED*) VERDE E VERMELHO EM QUEIMADURAS
CUTÂNEAS DE TERCEIRO GRAU**

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.

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

Área de concentração: Clínica Odontológica

CAMPINA GRANDE – PB
2023

E 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.

G635a Gonçalves, Rhuan Isllan dos Santos.
Análise dos mastócitos a fotobiomodulação com diodo emissor de luz (LED) verde e vermelho em queimaduras cutâneas de terceiro grau [manuscrito] / Rhuan Isllan dos Santos Gonçalves. - 2023.
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. Terapia com luz de baixa intensidade. 2. Fototerapia. 3. Queimaduras. I. Título

21. ed. CDD G635

RHUAN ISLLAN DOS SANTOS GONÇALVES

**ANÁLISE DOS MASTÓCITOS A FOTOBIMODULAÇÃO COM DIODO
EMISSOR DE LUZ (LED) VERDE E VERMELHO EM QUEIMADURAS
CUTÂNEAS DE TERCEIRO GRAU**

DATA DA DEFESA: 14/08/2023

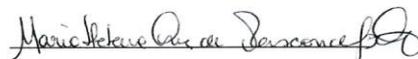
BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr. José de Alencar Fernandes Neto/ UNIFACISA
Membro Titular (1º examinador)**



**Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB
Membro Titular (2º examinador)**



**Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão/ UEPB
Membro Titular (Orientadora)**

Dedico esta dissertação a uma divindade maior que chamo de Deus, que generosamente me guiou ao caminho da docência e me fez evoluir durante todo este percurso. Agradeço por cada experiência vivenciada, por cada obstáculo superado e por cada aprendizado adquirido ao longo dessa jornada.

In memoriam, Iraci dos Santos Alexandre, expresso meu mais profundo agradecimento por todo amor e carinho que ela transbordou em torno de mim e de todos aqueles que a rodeavam. Seu coração imenso e sua inabalável fé foram fontes de inspiração constantes. Recordo-me com carinho do terno que me apresentou para minha colação de grau, e apesar de não tê-la presenciado fisicamente esteve presente junto ao meu coração, assim como no momento desta defesa, onde desejo que sua presença possa ser sentida, permitindo que ela testemunhe mais esta vitória.

Eterno amor vovó Iraci.

Que essa dissertação possa ser uma manifestação do amor, da dedicação e do compromisso que carrego no coração, e que possa contribuir para o avanço do conhecimento e para o bem-estar daqueles que terei a honra de ensinar. Que a luz divina continue a guiar meus passos, inspirando-me a buscar a excelência em tudo que faço.

“Aqui está o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”

(Antoine de Saint- Exupéry, O Pequeno Príncipe).

Agradecimentos Especiais

A **Professora Doutora Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, minha orientadora durante o curso de mestrado. É com imensa gratidão que expresso o quanto valorizo a confiança que a senhora depositou em mim, mesmo quando duvidei do meu próprio potencial. Seu apoio incansável, seus sorrisos encorajadores, seus abraços acolhedores e até mesmo suas reclamações construtivas têm sido fontes inestimáveis de motivação para o meu contínuo crescimento. Além disso, sou profundamente grato pela sua preocupação constante comigo, um homem que, apesar de ter crescido, ainda carrega consigo a ansiedade de um adolescente (vide seus puxões de orelha comigo roendo unhas). Sua presença e apoio têm sido essenciais para o meu avanço nesta jornada e sinto uma imensurável gratidão por tudo.

Ao **Professor Doutor Cassiano Francisco Weege Nonaka**, agradeço por toda dedicação que desempenha com seus pós-graduandos, sendo eles seus orientandos ou não. No tempo corrido de nossa convivência, sinto que construí uma relação além das minhas expectativas, sua presença diária, seu empenho em ajudar as pessoas a alcançarem seus objetivos é uma qualidade que deve ser sempre lembrada ao senhor, isto lhe faz um grande homem. Obrigado por toda ajuda, por toda sensibilidade, pelas horas ultrapassadas em laboratório e claro uma menção honrosa aos almoços nutritivos de coxinha, sanduíches e chocolates (só as vezes né?).

Expresso minha profunda gratidão a ambos, por generosamente compartilharem um pouco de seu tempo para me ensinar que a docência é uma jornada destinada a almas sensíveis, dispostas a renunciar constantemente na missão de formar profissionais em um sistema por vezes desmerecido em sua importância.

Agradecimentos

A **Deus** por ter guiado meu caminho até aqui, fortalecido e colocado algumas das melhores pessoas da terra nesta minha jornada. Aos meus pais, **Jocileide dos Santos Alexandre Gonçalves** e **Francisco Adriano Gonçalves de Sousa**, sertanejos do qual tenho a honra de compartilhar do mesmo sangue, agradeço por todo apoio que me ofereceram ao longo da minha jornada de vida, mesmo quando talvez não compreendessem completamente. Peço desculpas pelos momentos em que me ausentei do convívio familiar, ou agi de forma rude ao parecer ocupado demais. Amo vocês imensamente e sou grato por poder chamá-los de pais. Não há desafio e recompensa maior para mim que poder vê-los com um grande sorriso ao demonstrar orgulho do filho que vocês criaram.

Á minha irmã, **Thauany dos Santos Gonçalves**, por sua amizade fiel, por ficar ao meu lado em momentos difíceis da vida, por apesar de mais nova, ter me dado conselhos como uma sabia irmã mais velha. Obrigado por todos os docinhos de madrugada que “roubava da geladeira e você fingia que não via pela manhã. Por fim, obrigado por sempre expressar tamanho orgulho ao me olhar, tenho imenso orgulho da mulher que você é!

Aos meus avôs, **José Alexandre** e **Geni Gonçalves da Silva Sousa**, pelo incentivo e pelo orgulho expresso em abraços e no pedido de benção que me deram. *In memoriam*, aos meus avôs **Iraci dos Santos Alexandre** e **Valdemiro Bezerra de Sousa**, mesmo que sem a presença física sempre fazem parte de cada uma de minhas conquistas. As lembranças de suas lutas são fonte de coragem para minha vida.

A **todos meus familiares** grandes entusiastas dos meus sonhos e que sempre se fazem presentes em minha vida, me incentivando. Em especial, minhas quatro tias, minhas segundas mães, e também ao brilho dos meus olhos, a pequena Nicole a qual tenho a sorte de ser padrinho e que iluminou esses dois anos de mestrado com seus pequenos sorrisos.

Á técnica do Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, **Denise Núbia Souza**, por representar bem mais que técnica, uma amiga, pessoa de alma sensível, que me ensinou e foi companheira em vários dias dessa caminhada. A todos os colegas que compartilharam a nossa rotina do Laboratório de Histopatologia Oral, em especial aos amigos **Elton**, **Vanessa**, **Camila**, **Laís**, **Thamyres**, aos **Prof. Jhon Lennon Silva Cunha**, **Pollianna Muniz Alves** e

Manuel Antonio Gordón-Núñez por tornarem o cansaço mais animado e alegre. Dividindo experiências, conquistas, sorrisos e muito conhecimento. Sou grato por poder ter dividido este ambiente com vocês.

A todos os **colegas da turma 2021.2** de mestrado, não sei como agradecer por dividirem comigo todos os bons e maus momentos dessa trajetória, sempre regados de bom humor e um excelente convívio.

Ao grupo de pesquisa, em especial aos amigos, **Sofia, André e Alieny** a quem tenho a honra de chamar de parceiros, sinto-me grato por poder contar com apoio de vocês, sei que é muito difícil se fazer amigos no meio acadêmico, mas fiz, vocês são excepcionais.

Aos meus amados amigos, **César, João, Jéssica, Juliana, Matheus, Marcela, Micaela e Yeza**, pergunto: O que é do homem sem alianças? Vocês são minha estrutura de apoio incondicional, com quem posso contar a qualquer hora, sobre qualquer coisa, peço desculpas por muitas vezes ser relapso, pelas faltas de dizer que vos amo incondicionalmente, sem vocês este homem seria apenas um menino.

Ao professor e amigo **Dr. José de Alencar Fernandes Neto**, por todas as horas de ensinamentos transmitidos, dedicação e pelo exemplo de profissionalismo. Suas contribuições foram muito importantes para minha formação, obrigado pela participação na banca de qualificação e nessa defesa e por todas as suas considerações.

Ao **Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)**, em especial ao **Prof. Dr. Joabe dos Santos Pereira**, pela colaboração para a realização de etapas fundamentais desta pesquisa científica.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, por todo trabalho desempenhado todos os dias pelo bom funcionamento do programa. À Secretária de Pós-Graduação **Ahyanna Thammyres Monteiro de Nobrega**, por sempre estar movendo montanhas para resolver meus problemas e minhas dúvidas, você é um anjo!

A todos os **funcionários do Departamento de Odontologia da UEPB**, por trabalharem

todos os dias para fornecerem um ambiente propício para realizar as atividades acadêmicas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao **Centro Universitário UniFacisa**, por ter permitido o desenvolvimento de parte desta pesquisa científica em suas instalações.

“No sertão, onde o tempo é feito de cicatrizes, nossas vozes ecoam como resistência.” (Itamar Vieira Junior, Torto Arado).

RESUMO

As queimaduras são lesões cutâneas que desencadeiam uma resposta inflamatória. Os mastócitos, células imunológicas, desempenham papel central nesse processo, sintetizando, armazenando e liberando potentes mediadores químicos do processo inflamatório, através da sua degranulação, afetando a cicatrização e a regeneração tecidual. É conhecido que o Laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) e o Diodo Emissor de Luz (*LED*) de baixa potência, podem modular o processo inflamatório. Porém ainda é escasso estudos que avaliem os efeitos dessas terapias de fotobiomodulação sobre os mastócitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da fotobiomodulação com *LED* verde e vermelho sobre os mastócitos e seus subtipos presentes em queimaduras de terceiro grau. A amostra foi composta por 75 ratos *Wistar*, divididos em três grupos: Controle (CTRL) (n=25), *LED* vermelho (VERM) (n=25) e *LED* verde (VERD) (n=25), com subgrupos de cinco animais para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21, 28 e 32 dias). Após indução da queimadura, a terapia foi realizada diariamente com VERM (630 ± 10 nm, emissão contínua, Dose = 9 J/cm², 300 mW, 30 segundos, por ponto) e VERD (520 ± 30 nm, emissão contínua, Dose = 60 J/cm², 180 mW, 30 segundos, por ponto) em contato com quatro pontos da ferida (total: 36 J/cm², 120 segundos e 240 J/cm², 120 segundos) e no CTRL houve apenas simulação do tratamento. Após coloração com Azul de Toluidina, foram identificados e quantificados os três tipos de mastócitos com base no grau de degranulação das células: Mastócitos Tipo 1 (MCT1), Mastócitos Tipo 2 (MCT2), e Mastócitos Tipo 3 (MCT3), os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney e descritivamente, considerando um nível de significância de 5% (p<0,05). Em relação ao grupo controle, os grupos irradiados mostraram um aumento no número de mastócitos totais (MCT_{totais}) em 7, 14 e 21 dias (p<0,05), correspondentes aos estágios iniciais de inflamação, uma diminuição nos grupos irradiados de mastócitos tipo 1 (MCT1) em todos os períodos de tempo quando comparados ao CTRL (p<0,05). Os índices mais significativos estiveram nos mastócitos tipo 3, com intensa degranulação, observados no VERM aos 7, 14, 21 dias (p<0,009) e do VERD aos 14 dias (p<0,009) e 32 dias (p<0,028) comparados ao controle, e entre o VERM e o VERD aos 7 dias (p<0,009). Dessa forma, foi possível concluir que dependendo do período, o *LED* vermelho e verde mostraram-se efetivos no processo de modulação da degranulação de mastócitos em queimaduras no dorso de ratos.

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

ABSTRACT

Burns are skin lesions that trigger an inflammatory response. Mast cells, immune cells, play a central role in this process, synthesizing, storing and releasing potent chemical mediators of the inflammatory process, through their degranulation, affecting wound healing and tissue regeneration. It is known that Laser (light amplification by stimulated emission of radiation) and low power Light Emitting Diode (LED) can modulate the inflammatory process. However, studies evaluating the effects of these photobiomodulation therapies on mast cells are still scarce. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of photobiomodulation with green and red LED on mast cells and their subtypes present in third-degree burns. The sample consisted of 75 Wistar rats, divided into three groups: Control (CTRL) (n=25), red LED (VERM) (n=25) and green LED (VERD) (n=25), with subgroups of five animals for each time of euthanasia (7, 14, 21, 28 and 32 days). After burn induction, therapy was performed daily with VERM (630 ± 10 nm, continuous emission, Dose = 9 J/cm^2 , 300 mW, 30 seconds, per point) and VERD (520 ± 30 nm, continuous emission, Dose = 60 J/cm^2 , 180 mW, 30 seconds, per point) in contact with four wound points (total: 36 J/cm^2 , 120 seconds and 240 J/cm^2 , 120 seconds) and in the CTRL there was only treatment simulation. After staining with Toluidine Blue, the three types of mast cells were identified and quantified based on the degree of cell degranulation: Type 1 Mast Cells (MCT1), Type 2 Mast Cells (MCT2), and Type 3 Mast Cells (MCT3), the data were analyzed using the Mann-Whitney test and descriptively, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). In relation to the control group, the irradiated groups showed an increase in the number of total mast cells (total MCT) at 7, 14 and 21 days ($p < 0.05$), corresponding to the initial stages of inflammation, a decrease in the irradiated groups of type mast cells 1 (MCT1) at all time periods when compared to CTRL ($p < 0.05$). The most significant indices were in type 3 mast cells, with intense degranulation, observed in VERM at 7, 14, 21 days ($p < 0.009$) and VERD at 14 days ($p < 0.009$) and 32 days ($p < 0.028$) compared to control, and between VERM and VERD at 7 days ($p < 0.009$). Thus, it was possible to conclude that depending on the period, the red and green LED were effective in the modulation process of mast cell degranulation in burns on the back of rats.

Keywords: Burns; Mast Cells; Low-Level Light Therapy; Phototherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	23
Quadro 2.	Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia....	25
Quadro 3.	Características dos tratamentos realizados na pesquisa.....	25
Figura 1.	Mediadores dos mastócitos e suas funções no reparo em lesões (Modificado de Wernersson, Pejler, 2014; Wilgus, Wulff; 2014).....	18
Figura 2.	(A) Administração realizada na região intraperitoneal utilizando uma seringa estéril de uso único (com agulha) de 1mL para insulina. (B) Realização da tricotomia na região dorsal.....	23
Figura 3.	(A) Aquecimento do instrumento metálico na chama azul do maçarico por 40s. (B) Instrumento metálico aquecido em contato com a pele do animal por 20s.....	24
Figura 4.	(A) Aplicação do <i>LED</i> vermelho. (B) Aplicação do <i>LED</i> verde. (C) Os 4 pontos de aplicação realizados no dorso do rato	26
Figura 5.	(A) Equipamento <i>MoticEasyScan Pro</i> . (B) Software Aperio ImageScope.....	27
Figura 6.	(A) Mastócitos Tipo 1 (MCT1). (B) Mastócitos Tipo 2 (MCT2). (C) Mastócitos Tipo 3 (MCT3).....	28
Fig 1.	Gráfico box plot ilustrando a quantidade de mastócitos de acordo com os subtipos, em diferentes tempos de avaliação (7, 14, 21, 28 e 32 dias após a queimadura). a Mastócitos tipo 1. b Mastócitos tipo 2.....	45
Fig 2.	Gráfico box plot ilustrando a quantidade de mastócitos de acordo com os subtipos, em diferentes tempos de avaliação (7, 14, 21, 28 e 32 dias após a queimadura). a Mastócitos tipo 3. b Mastócitos totais.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da quantidade de mastócitos subtipos 1, 2, 3 e totais em grupos experimentais, em diferentes tempos de avaliação (7, 14, 21, 28 e 32 dias após a queimadura).....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Mais ou menos (símbolo matemático).
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais.
Cm	Centímetro (unidade de comprimento).
cm²	Centímetro quadrado (unidade de comprimento).
cm³	Centímetro cúbico (unidade de comprimento).
C°	Grau Celsius (unidade de temperatura).
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
CTR	Controle.
EGF	Do inglês <i>epidermal growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento epidérmico.
FCM	Faculdade de Ciências Médicas.
FGF-2	Do inglês <i>fibroblast growth factor-2</i> , traduzido como fator de crescimento fibroblástico-2.
g	Gramma (unidade de medida de massa).
IL 10	Do inglês <i>interleukyne-10</i> , traduzido como interleucina-10.
IL 8	Do inglês <i>interleukyne-8</i> , traduzido como interleucina-8.
IL-1	Do inglês <i>interleukyne-1</i> , traduzido como interleucina-1.
IL-4	Do inglês <i>interleukyne-4</i> , traduzido como interleucina-4.
IL-6	Do inglês <i>interleukyne-6</i> , traduzido como interleucina-6.
J	Joule (unidade de energia).
Kg	Quilograma (unidade básica de massa).
KGF	Do inglês <i>keratinocyte growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento de queratinócito.
LED	Do inglês <i>Light Emitting Diode</i> , traduzido como Diodo Emissor de Luz.
MCP-1	Do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> , traduzido como proteína quimioatraente de monócitos-1.
MCT	Mastócito.
MCT 1	Mastócitos tipo 1.
MCT 2	Mastócitos tipo 2.
MCT 3	Mastócitos tipo 3.
MCTs	Mastócitos.
Mg	Miligrama (unidade de massa).
MIP-alpha	Do inglês <i>macrophage inflammatory protein-1 Alpha</i> , traduzido como proteínas inflamatórias de macrófagos-alfa.
ml	Mililitro (unidade de volume).
mW	Miliwatt (unidade de potência).
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.
s	Segundos (unidade de medida de tempo).
SP	São Paulo (estado do Brasil).
TGF-beta	Do inglês <i>transforming growth factor-beta</i> , traduzido como fator de transformação de crescimento beta.
TNF-alpha	Do inglês <i>tumor necrosis factor-alfa</i> , traduzido como fator de necrose tumoral

alfa.

VEGF

Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 16
2	OBJETIVOS..... 20
2.1	Objetivo geral..... 20
2.2	Objetivos específicos..... 20
3	METODOLOGIA..... 21
3.1	Considerações éticas..... 21
3.2	Caracterização do estudo..... 21
3.3	Amostra..... 21
3.4	Grupos experimentais..... 21
3.5	Variáveis..... 21
3.6	Anestesia e tricotomia..... 22
3.7	Indução da queimadura..... 23
3.8	Características do <i>LED</i>..... 24
3.9	Características do tratamento..... 24
3.10	Eutanásia dos animais..... 25
3.11	Processamento histológico..... 25
3.12	Análise morfológica..... 26
3.12.1	Identificação e quantificação dos mastócitos..... 26
3.13	Análise estatística..... 27
4	ARTIGO..... 28
4.1	Apresentação..... 28
4.2	Artigo a ser submetido..... 29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 46
	REFERÊNCIAS..... 47
	APÊNDICE A..... 52
	ANEXO A..... 53
	ANEXO B..... 54

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A pele, sendo a camada externa e maior órgão do corpo, atua como uma barreira física e proporciona proteção direta ou indireta contra uma variedade de fatores pró-oxidantes prejudiciais (Čoma *et al.*, 2021; Lateef *et al.*, 2019; Darby *et al.*, 2014). Além disso, sua estrutura complexa inclui diferentes camadas, como a epiderme, a derme e a hipoderme, cada uma desempenhando papéis essenciais na regulação da temperatura, hidratação e sensação, enquanto também sendo suscetíveis a graus variados de queimaduras e lesões cutâneas, resultantes de exposição a calor, substâncias químicas ou radiação ultravioleta (Atiakshin; Buchwalow; Tiemann, 2020).

Classificadas em diferentes graus de acordo com a profundidade e a extensão da lesão, as queimaduras de terceiro grau são caracterizadas por uma destruição completa da epiderme e derme, atingindo também tecidos mais profundos, como músculos e ossos (Čoma *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2020; Adorno, 2019; Brassolatti *et al.*, 2016).

As queimaduras de terceiro grau são amplamente reconhecidas como as lesões mais graves na pele, acarretando consequências significativas para a pele. Essas lesões podem ocasionar perda de sensibilidade na área afetada e resultar em incapacidade funcional, uma vez que a pele desempenha um papel fundamental na proteção, regulação térmica e percepção sensorial do organismo (Andrade *et al.*, 2020; Adorno, 2019; Brassolatti *et al.*, 2016).

Essas queimaduras são caracterizadas por apresentarem uma coloração pálida ou escura, além de uma textura seca e rígida, destacando que essas lesões podem cicatrizar com a contração das bordas, culminando em deformidades ou na formação de cicatrizes. É válido ressaltar que a sensação de dor frequentemente é reduzida ou inexistente em tais casos, devido à profundidade da lesão que afeta as terminações nervosas da área (Čoma *et al.*, 2021; Lateef *et al.*, 2019; Oryan; Alemzadeh; Moshiri, 2017; Darby *et al.*, 2014).

O processo inflamatório é desencadeado imediatamente após a lesão, visando à remoção de detritos celulares e a ativação de MCTs, as chamadas sentinelas do sistema imunológico. A liberação de histamina por esses tipos celulares promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, permitindo o recrutamento de células inflamatórias para o local afetado (Burgess *et al.*, 2022; Yeganeh; Tahmasebi; Esmailzadeh, 2022).

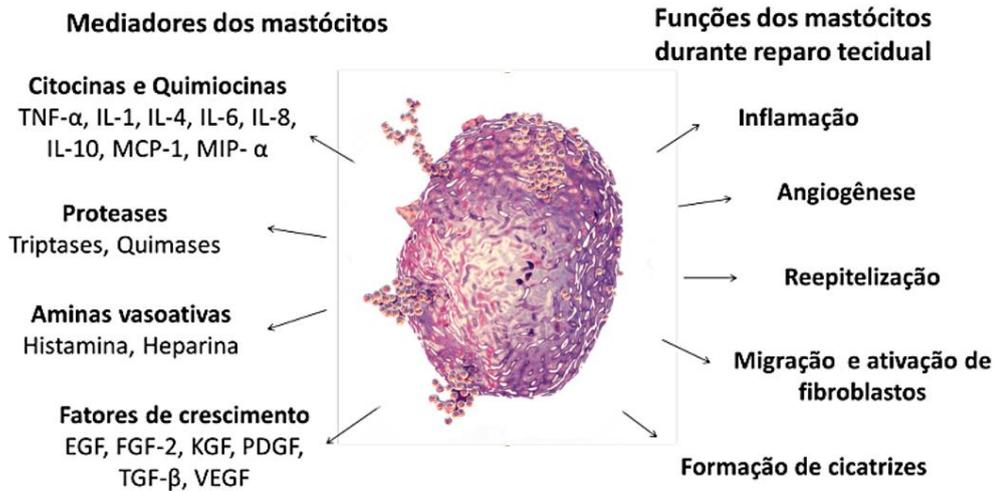
A resposta inflamatória é crucial para o início do processo, uma vez que estimula a liberação de fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores que desempenham papel fundamental na proliferação e migração de células envolvidas na cicatrização (Lateef *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2016; Freitas; Hamblin, 2016).

Durante a fase de reparo tecidual, ocorre a ativação de células-chave, como fibroblastos e queratinócitos, que desempenham um papel fundamental na síntese de novo tecido, visando à restauração da integridade da pele. No entanto, em queimaduras de terceiro grau, o processo de reparo apresenta desafios particulares devido à extensão e profundidade da lesão (Atiakshin *et al.*, 2023; Čoma *et al.*, 2021; Darby *et al.*, 2014).

A degradação da matriz extracelular lesionada e a síntese de novo tecido são etapas cruciais no processo de reparação de queimaduras e restauração da integridade cutânea (Atiakshin *et al.*, 2023; Čoma *et al.*, 2021). Esses processos são cuidadosamente regulados por interações complexas entre diferentes tipos celulares e mediadores bioquímicos. As queimaduras geralmente resultam em isquemia tecidual e inflamação, levando ao aumento do número de MCT, que desempenham um papel significativo no controle desses eventos bioquímicos e celulares durante o processo pró-inflamatório e de reparação tecidual em queimaduras (Atiakshin *et al.*, 2023; Komi; Khomtchouk; Santa Maria, 2020; Wilgus; Wulff, 2014).

Os MCTs são células do sistema imunológico residentes nos tecidos, desempenhando funções multifacetadas na resposta inflamatória e na modulação do processo de reparo tecidual (Komi; Khomtchouk; Santa Maria, 2020; Plum *et al.*, 2020). Durante a degranulação, os MCTs liberam uma série de mediadores, incluindo fatores quimiotáticos, citocinas e proteases (Figura 1), que contribuem para a degradação da matriz extracelular lesada e para a síntese de novo tecido. Além disso, os MCTs armazenam e liberam proteínas anti-inflamatórias envolvidas na regulação da inflamação, apoptose e diferenciação celular (De Santana Cerqueira *et al.*, 2023; Bagheri *et al.*, 2018; Wernersson; Pejler, 2014; Wilgus; Wulff, 2014).

Figura 1. Mediadores dos mastócitos e suas funções no reparo em lesões. Os vários mediadores químicos liberados contribuem nas diferentes fases do reparo tecidual (Modificado de Wernersson, Pejler, 2014; Wilgus, Wulff; 2014).



Fonte: do autor.

Dessa forma, as interações dos MCTs no processo de reparo tecidual em queimaduras de terceiro grau têm sido objeto de estudo e podem influenciar a eficiência e a qualidade da cicatrização (Atiakshin *et al.*, 2023; Atiakshin; Buchwalow; Tiemann, 2020; Plum *et al.*, 2020; Bagheri *et al.*, 2018).

Estudos que investigaram a expressão e quantificação dos mastócitos no processo de reparo de tecidual, por meio da terapia de fotobiomodulação, demonstraram resultados promissores do potencial dessas células no processo inflamatório, quando irradiadas, abrindo novas perspectivas, para novos estudos (De Santana Cerqueira *et al.*, 2023; Ahmadi *et al.*, 2022; Bagheri *et al.*, 2018).

A terapia de fotobiomodulação é uma modalidade terapêutica que utiliza a luz como agente para modular processos biológicos e desencadear respostas fisiológicas benéficas. Uma de suas fontes luminosas é através do uso de diodos emissores de luz (LED) (Dompe *et al.*, 2020; Brassolati *et al.*, 2016; Avci *et al.*, 2013).

Os LEDs são dispositivos semicondutores capazes de emitir luz em diferentes comprimentos de onda, não possui as características de colimação, coerência espacial e temporal, típicas dos lasers, no entanto, a resposta celular à terapia com luz não está necessariamente relacionada a propriedades específicas da luz laser, uma vez que essas propriedades são perdidas durante a interação da luz com o tecido biológico (Hadis *et al.*, 2017; Paraguassú *et al.*, 2014).

A terapia de fotobiomodulação com LED pode ser utilizada tanto em tratamentos

convencionais como complementares, e assim como a terapia a laser, tem demonstrado efeitos positivos na promoção da angiogênese e vascularização do tecido (Farias; Catão, 2022; Melo *et al.*, 2018; Fernandes Neto; Nonaka; Catão, 2019; Oliveira Sampaio *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013).

Estudos que investigaram a eficácia da fotobiomodulação utilizando luz LED vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em modelos *in vivo* relataram uma redução significativa no número de células inflamatórias nos grupos estudados (Silveira *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2018). Além disso, observou-se uma diminuição na área da ferida, um aumento no número de fibroblastos, síntese de colágeno e aumento de índice angiogênico nos tecidos tratados com terapia de fotobiomodulação (Fernandes Neto; Nonaka; Catão, 2019; Neves *et al.*, 2014; Oliveira Sampaio *et al.*, 2013).

Estudos encontrados na literatura científica investigaram os efeitos *in vivo* do LED verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau na pele. Essas pesquisas observaram uma aceleração no processo de cicatrização dessas lesões, atribuída ao estímulo da transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Simões *et al.*, 2020), formação de novos vasos sanguíneos (Simões *et al.*, 2020; Catão *et al.*, 2015), efeito anti-inflamatório (Catão *et al.*, 2016) e à maturação das fibras colágenas nos períodos de 3, 7, 11, 21 e 28 dias (Simões *et al.*, 2020).

Embora existam alguns estudos do uso de LED em queimaduras (Simões *et al.*, 2020; Brassolati *et al.*, 2016; Catão *et al.*, 2015) nenhum expõe até o momento a análise dos efeitos da terapia de LED vermelho e verde sobre MCT, investigações anteriores indicaram a importância da quimase liberada por essas células no processo de cicatrização de feridas induzidas por queimadura em ratos (Atiakshin *et al.*, 2023), relacionada à densidade de capilares, acúmulo de colágeno e número de MCT.

Os resultados dessas análises poderão ser úteis para o melhor entendimento da ação dos MCTs no local da lesão e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento de queimaduras. A presente investigação teve como objetivo determinar os efeitos da fotobiomodulação verde e vermelho em queimaduras cutâneas de terceiro grau.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da fotobiomodulação com LED vermelho e verde nos MCTs em queimaduras de terceiro grau.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação e quantificação dos MCTs e seus subtipos presentes nas áreas de queimaduras de terceiro grau tratadas com terapia de fotobiomodulação utilizando LED vermelho e verde, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 32 dias.
- Comparar as quantidades de MCTs e seus subtipos entre os grupos terapêuticos tratados com LED vermelho e verde, em relação ao grupo controle não tratado, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 32 dias.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB (nº do protocolo: 6809092016) seguindo os preceitos da lei brasileira nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO A).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

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

3.3 AMOSTRA

Foram utilizados 75 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias e massa corpórea variando entre 200 e 250 gramas. Esses animais foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) em Campina Grande/PB. Para o alojamento dos animais, foram utilizadas caixas plásticas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com capacidade para abrigar 5 ratos por caixa. Essas caixas foram forradas com cama de maravalha e possuíam tampa de grade metálica para permitir a ventilação adequada. Os ratos tinham acesso à água *ad libitum* por sucção em frasco de vidro e foram alimentados com ração padronizada (Presence® Ratos e Camundongos, Linha Laboratório, Paulínia, SP, Brasil). Os animais foram mantidos à temperatura do biotério em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com um ciclo de luz controlado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Não houve exclusão de animais nesta pesquisa.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 75 animais foram divididos por randomização simples em três grupos experimentais: grupo controle (CTRL) (n=25), grupo LED vermelho (VERM) (n=25) e grupo LED verde (VERD) (n=25). Cada grupo experimental foi subdividido em subgrupos de 5 ratos para cada tempo de eutanásia, que ocorreram nos dias 7, 14, 21, 28 e 32 após a realização da queimadura.

3.5 VARIÁVEIS

As variáveis independentes e dependentes analisadas no presente estudo estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1. Elenco de variáveis analisadas no estudo.

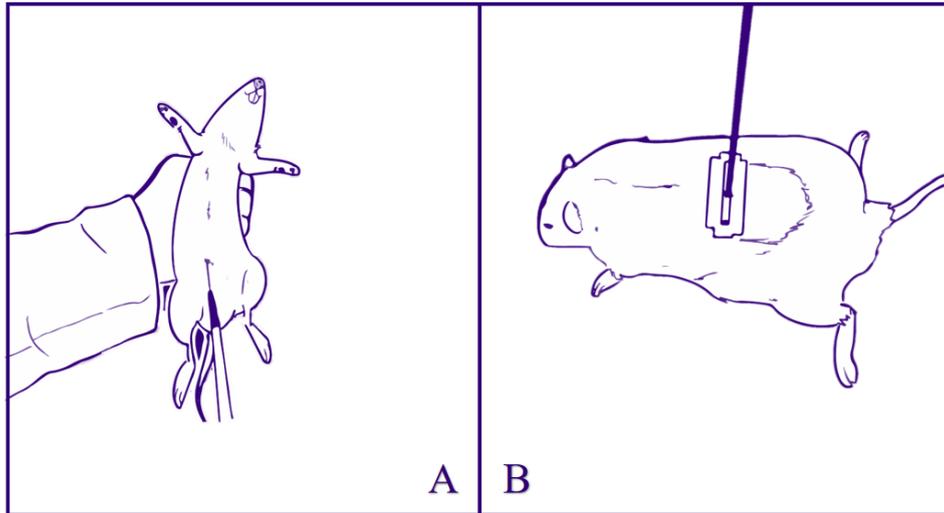
VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Mastócitos	Identificação e Quantificação dos Mastócitos.	- MCTs Tipo 1; - MCTs Tipo 2; - MCTs Tipo 3.	Dependente (Quantitativa)
Intervenção	Tipo de terapia utilizada.	- Grupo Controle; - Grupo LED vermelho; - Grupo LED verde.	Independente (Categórica)
Tempo de Eutanásia	Padrão de dias para eutanásia dos animais.	- 7 dias; - 14 dias; - 21 dias; - 28 dias; - 32 dias.	Independente (Categórica)

Fonte: do autor.

3.6 ANESTESIA E TRICOTOMIA

Previamente á da tricotomia e indução da queimadura nos animais foi administrada uma associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (Dopaser®, Hertape, Juatuba, MG, Brasil). A administração foi realizada na região intraperitoneal utilizando uma seringa estéril de uso único (com agulha) de 1mL para insulina (SR®, Manaus, AM, Brasil) (FIGURA 2). Após constatar o estado anestésico profundo, os animais foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a tricotomia na região dorsal, utilizando uma lâmina de barbear (LORD® co., Alexandria, Egito), um porta-agulha e uma solução de digliconato de clorexidina 4% (Riohex® 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), uma metodologia utilizada por nosso grupo de pesquisa (Fernandes Neto; Nonaka; Catão, 2019) (FIGURA 2).

Figura 2. (A) Administração foi realizada na região intraperitoneal utilizando uma seringa estéril de uso único (com agulha) de 1mL para insulina. (B) Realização da tricotomia na região dorsal.

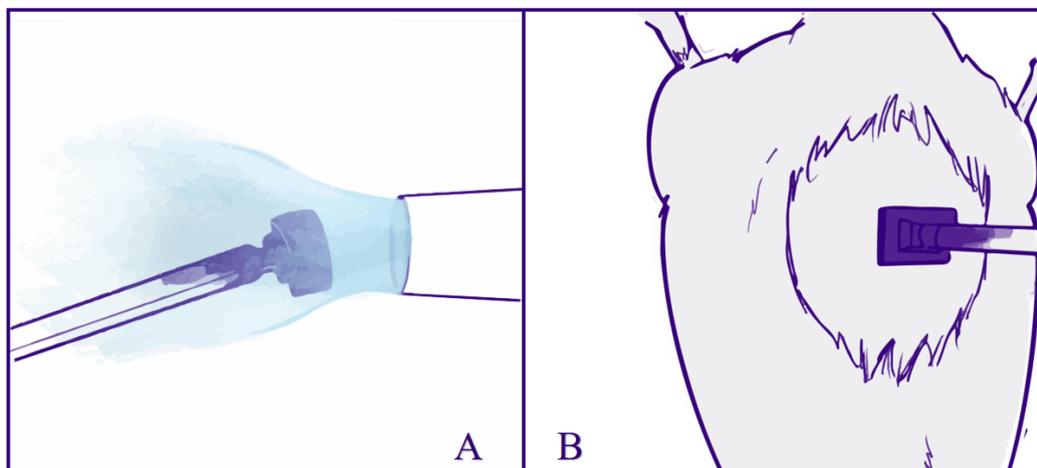


Fonte: do autor.

3.7 INDUÇÃO DA QUEIMADURA

Antes da queimadura foi realizada antissepsia tópica na pele do animal com uma gaze estéril embebida em solução de digliconato de clorexidina 0,5% (Riohex® 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Em seguida, o operador utilizou um instrumento metálico previamente confeccionado com a ponta ativa chata, plana, com dimensão de 1 cm³ (FIGURA 3) aquecida com na chama azul de um maçarico por 40 segundos e encostou na pele do dorso do animal por 20 segundos (FIGURA 3). Essa metodologia foi baseada no trabalho de Catão *et al.* (2015). A confirmação das queimaduras de terceiro grau foi feita pela observação de destruição total da epiderme e derme nos cortes histológicos.

Figura 3. (A) Aquecimento do instrumento metálico na chama azul do maçarico por 40s. (B) Instrumento metálico aquecido em contato com a pele do animal por 20s.



Fonte: do autor.

3.8 CARACTERÍSTICAS DO LED

Foi utilizado o LED vermelho do equipamento eletromédico *Bios Therapy II*® (BIOS Equipamentos Médicos, São José dos Campos, SP, Brasil) e o LED verde da marca *D-Light Green*® (KONDORTECH, São Paulo, SP, Brasil) para a realização da terapia de fotobiomodulação. As informações técnicas de ambos os equipamentos podem ser encontradas no quadro 2.

Quadro 2. Informações técnicas dos equipamentos utilizados para a fototerapia.

Parâmetros	<i>Bios Therapy II</i> ® (LED Vermelho)	<i>D-Light Green</i> ® (LED Verde)
Potência	300 mW	180 mW
Comprimento de onda	630 ± 10 nm	520 ± 30 nm
Densidade de Potência	0,03W/cm ²	0,18W/cm ²
Medida da ponta	0,7 cm	1,3 cm
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo

Fonte: do autor.

3.9 Características dos Tratamentos

A luz LED foi aplicada imediatamente após a indução da queimadura por um único operador devidamente calibrado. As aplicações com luz LED foram repetidas diariamente, exceto nos dias de eutanásia (FIGURA 4). As demais características do tratamento podem ser encontradas no quadro 3.

Quadro 3. Características dos tratamentos realizados na pesquisa.

GRUPO CONTROLE	GRUPO VERMELHO	GRUPO VERDE
Simulação de tratamento de LED.	Aplicações diárias (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual e em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida, depositando 9 J/cm ² , 30 segundos por ponto, totalizando 36 J/cm ² por sessão.	Aplicações diárias (exceto nos dias de eutanásia), de forma pontual e em contato com quatro pontos coincidentes com os ângulos da ferida, depositando 60 J/cm ² , 30 segundos por ponto, totalizando 240 J/cm ² por sessão.

Fonte: do autor.

Foi seguido rigorosamente todas as normas de biossegurança, incluindo o uso de jaleco, máscara, luvas de procedimento e óculos de proteção para luz intensa. Além disso, foi utilizado plástico filme de PVC na ponteira do equipamento como barreira de proteção, a fim de prevenir possíveis infecções cruzadas.

Figura 4. (A) Aplicação do LED vermelho. (B) Aplicação do LED verde. (C) Os 4 pontos de aplicação realizados no dorso dos ratos.



Fonte: do autor.

3.10 EUTÁNASIA DOS ANIMAIS

Após o período experimental de cada subgrupo foi realizada a eutanásia dos animais, os quais foram alojados em uma caixa hermeticamente fechada com algodão embebido com halotano (Tanohalo® 1mL/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil). Dois avaliadores previamente calibrados constataram a morte dos animais por meio da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos. Em seguida as feridas foram excisadas, com bisturi e tesouras estéreis, respeitando uma margem de segurança de no mínimo 0,5 cm, envolvidas com uma fina gaze e acondicionadas em um recipiente plástico contendo formol a 10%, onde permaneceram submersas por 24 horas. Todos os recipientes foram devidamente etiquetados com o nome do grupo e subgrupo experimental, número do animal e data da eutanásia. Após a eutanásia, os animais foram recolhidos por uma empresa especializada e encaminhados para incineração.

3.11 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

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 Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Campus Central.

Os espécimes, fixados em formol a 10%, e incluídos em parafina, foram submetidos a

cortes de 3 μ m de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro, seguindo os protocolos descritos a seguir:

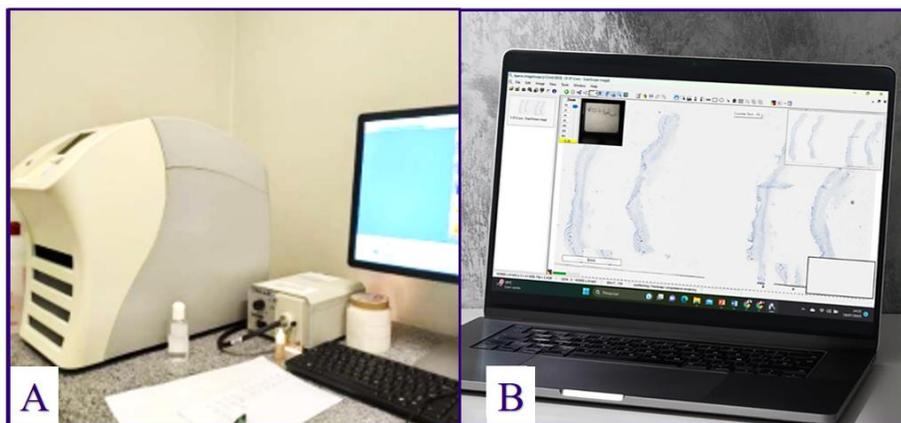
- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (tempo de 15 minutos cada);
- ⇒ Hidratação em água destilada (1 minuto);
- ⇒ Coloração com solução de azul de toluidina (0,1g de azul de toluidina + 100ml de água destilada) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água destilada (5 minutos);
- ⇒ Três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

3.12.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MASTÓCITOS

Após coloração em azul de toluidina, as lâminas coradas com azul de toluidina foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*Leica Biosystems Imaging, IL, USA*) com ampliação de x400 (Figura 5), e, posteriormente, visualizados no programa Aperio ImageScope 12.4.6.5003 (*Leica Biosystems Pathology Imaging, IL, USA*) (Figura 5).

Figura 5. (A) Equipamento Leica Biosystems Imaging. (B) Software Aperio ImageScope.

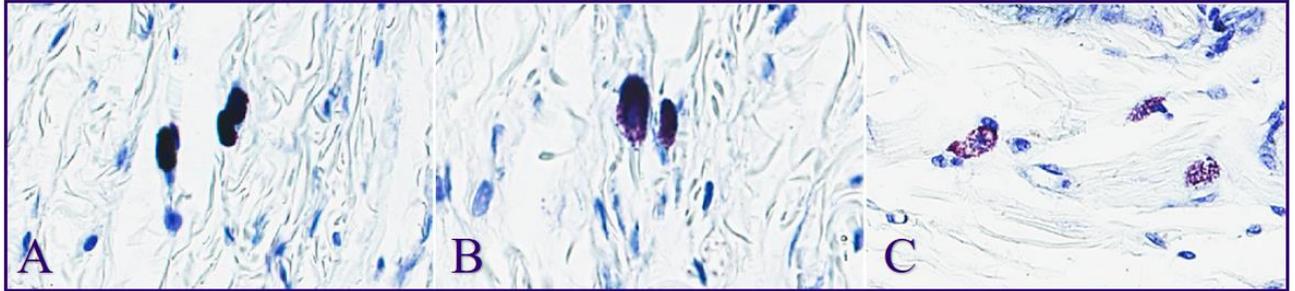


Fonte: do autor.

Para a contagem dos MCTs, um examinador previamente treinado, sem conhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos, avaliou toda a área viável da lesão, utilizando a ferramenta *Counter Tool*, de acordo com a metodologia adaptada de Bagheri et al. (2018). Durante a contagem, foram identificados os três tipos de MCTs com base no grau

de degranulação das células: MCTs intactos (mastócitos tipo 1 - MCT1); MCTs com grânulos liberados, mas com borda celular intacta (mastócitos tipo 2 – MCT2); MCTs com grande degranulação e desintegração parcial ou completa da borda celular (mastócitos tipo 3 – MCT3) (Figura 6).

Figura 6. (A) Mastócitos Tipo 1 (MCT1). (B) Mastócitos Tipo 2 (MCT2). (C) Mastócitos Tipo 3 (MCT3).



Fonte: do autor.

Todos os dados foram anotados em uma ficha específica (APÊNDICE A).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises morfológicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; *IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Os dados obtidos com análises dos MCTs foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. As comparações das medianas dos mastócitos entre os grupos de estudo foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises foram conduzidas considerando um 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: **“Resposta fotobiológica dos mastócitos ao Diodo Emissor de Luz (LED) verde e vermelho em queimaduras cutâneas de terceiro grau”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *Lasers in Medical Science* (ISSN: 1435-604X; Fator de impacto [2023]: 2.555; Qualis CAPES/Odontologia: A2), cujas normas para submissão de trabalhos estão apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Resposta fotobiológica dos mastócitos ao Diodo Emissor de Luz (LED) verde e vermelho em queimaduras cutâneas

Rhuan Isllan dos Santos Gonçalves¹, José de Alencar Fernandes Neto², Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão¹

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

²Departamento de Odontologia, Centro Universitário Unifacisa, Campina Grande, PB, Brasil.

Autor correspondente:

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia Rua Baraúnas,
351 – Bairro Universitário – Campina Grande – PB – Brasil CEP 58429-500 Phone/ Fax: +55
83 3315-3471

e-mail: mhcvcatao@gmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos fotobiomoduladores do Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho e verde nos MCTs e seus subtipos em queimaduras de terceiro grau em pele. Foram utilizados 75 ratos *Wistar*, divididos em controle (CTRL) (n=25), LED vermelho (VERM) (n=25) e LED verde (VERD) (n=25) com subgrupos (n=5) para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21, 28 e 32 dias). Os animais tratados foram irradiados com VERM (630 ± 10 nm, 300mW, $0,03\text{W}/\text{cm}^2$, $9\text{ J}/\text{cm}^2$, 30 segundos, por ponto) e VERD (520 ± 30 nm, 180mW, $0,18\text{ W}/\text{cm}^2$, $60\text{ J}/\text{cm}^2$, 30 segundos, por ponto) diariamente. Cortes histológicos foram corados em azul de toluidina e escaneados em alta resolução. Em sequência, foram quantificados os MCT (totais e subtipos (MCT1, MCT2 e MCT3) em toda a área viável das lesões. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos MCT2 entre os grupos e os tempos ($p > 0,05$). Os grupos irradiados mostraram um aumento no número de MCTTotais em 7, 14 e 21 dias ($p < 0,05$). Houve diminuição, nos grupos irradiados, de MCT1 em todos os períodos de tempo quando comparados ao CTRL ($p < 0,05$). Os índices mais significativos estiveram nos MCT3, com intensa degranulação, observados no VERM aos 7, 14, 21 dias ($p < 0,009$) e do VERD aos 14 dias ($p < 0,009$) e 32 dias ($p < 0,028$) comparados ao controle, e entre o VERM e o VERD aos 7 dias ($p < 0,009$). Os resultados sugerem que, dependendo do período, o LED vermelho e verde podem modular o processo de recrutamento e degranulação de MCT em queimaduras de terceiro grau em pele.

Introdução

As queimaduras cutâneas são lesões decorrentes da exposição ao calor, substâncias químicas, eletricidade ou radiação, podendo ocasionar danos extensos e graves à pele [1-3]. Classificadas em diferentes graus de acordo com a profundidade e a extensão da lesão, as queimaduras de terceiro grau são caracterizadas por uma destruição completa da epiderme e derme, atingindo também tecidos mais profundos, como músculos e ossos. Além do intenso sofrimento doloroso, tais lesões podem ocasionar perda de sensibilidade na área afetada e resultar em incapacidade funcional [1, 4, 5].

O processo de reparo dessas lesões envolve interações complexas entre diferentes tipos celulares e mediadores bioquímicos. As queimaduras geralmente resultam em isquemia tecidual e inflamação, levando ao aumento do número de MCTs, que desempenham um papel significativo no controle desses eventos celulares durante o processo de reparação tecidual de

queimaduras [6-8].

Os MCTs são células do sistema imunológico residentes nos tecidos, desempenhando funções multifacetadas na resposta inflamatória. Através de sua degranulação, liberam uma série de mediadores, incluindo fatores quimiotáticos, citocinas e proteases, que contribuem para o início do processo inflamatório e para a síntese de novo tecido [7, 8]. Dessa forma, as interações dos mastócitos no processo inflamatório e no reparo têm sido objeto de estudo na área de modulação de suas funções, por meio da fotobiomodulação abrindo novas perspectivas para estas células [6, 8, 9].

Diversos métodos terapêuticos têm sido investigados para aprimorar a cicatrização de feridas. Entre essas abordagens, destaca-se a terapia de fotobiomodulação utilizando o *Light Emitting Diode* (LED). Essa forma de irradiação, caracterizada por ser de baixa intensidade, não-térmica e não-ablativa, demonstrou a capacidade de estimular ou inibir diretamente processos celulares e biológicos envolvidos no processo de cicatrização [10-12].

Estudos que investigaram a eficácia da fotobiomodulação utilizando o *LED* vermelho na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em modelos *in vivo* relataram uma redução significativa no número de células inflamatórias nos grupos estudados [10, 13, 14]. Além disso, observou-se uma diminuição na área da ferida, um aumento no número de fibroblastos, síntese de colágeno e aumento de índice angiogênico nos tecidos tratados com terapia de fotobiomodulação [12, 15, 16].

Apenas um pequeno número de estudos encontrados na literatura científica investigou os efeitos *in vivo* do LED verde na cicatrização de queimaduras de terceiro grau na pele [10, 17, 18]. Essas pesquisas observaram uma aceleração no processo de cicatrização dessas lesões, atribuída ao estímulo da proliferação de fibroblastos, ao efeito anti-inflamatório e à maturação das fibras colágenas.

Entretanto, nenhum desses estudos trouxe até o momento a análise dos efeitos dessas terapias de LED vermelho e verde em MCT. Investigações anteriores indicaram a importância da quimase liberada por essas células no processo de cicatrização de feridas induzidas por queimadura em ratos, relacionada à densidade de capilares, acúmulo de colágeno e número de MCT [9, 19-21].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos fotobiomoduladores do LED vermelho e verde em MCTs presentes em queimaduras de terceiro grau.

Materiais e Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB (nº do protocolo: 6809092016) seguindo os preceitos da lei brasileira 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).

Animais

Foram utilizados 75 ratos machos *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias e massa corpórea entre 200 e 250 gramas, clinicamente saudáveis, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (Campina Grande, PB, Brasil). Os animais receberam água *ad libitum*, ração padronizada e a temperatura do biotério foi mantida em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro).

Grupos Experimentais

Os 75 animais foram divididos por randomização simples em grupo controle (CTRL) (n=25) e grupo LED vermelho (VERM) (n=25), e grupo LED verde (VERD) (n=25), com subgrupos de cinco ratos para cada tempo de eutanásia (7, 14, 21, 28 e 32 dias após a queimadura).

Anestesia e Tricotomia

Todos os animais foram anestesiados com uma associação de 100mg/kg de Ketamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 5mg/kg de Xilazina 2% (Dopaser®, Hertape, Juatuba, MG, Brasil), aplicada em região intraperitoneal. Constatado plano anestésico profundo, foi realizada a tricotomia no dorso, utilizando lâmina de barbear (LORD® co., Alexandria, Egito), porta-agulha e gel de digliconato de clorexidina 4% (Riohex® 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Queimadura

O operador calibrado realizou previamente à queimadura uma antissepsia tópica na pele

do animal, utilizando gaze estéril embebida em solução de digliconato de clorexidina 0,5% (Riohex® 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). O animal foi colocado em plano anestésico profundo, e a queimadura foi executada usando um instrumento metálico com uma ponta ativa plana e dimensão de 1 cm³. Essa ponta foi aquecida pelo contato direto com a chama azul de um maçarico por 40 segundos e encostada na pele do dorso do animal por 20 segundos, seguindo a metodologia de Catão et al., [17]. A confirmação das queimaduras de terceiro grau foi feita pela observação de destruição total da epiderme e derme nos cortes histológicos.

Terapia de fotobiomodulação

Com os equipamentos *Bios Therapy II*® (Bios Equipamentos Médicos, São José dos Campos, SP, Brasil) e *D-Light Green*® (Kondortech, São Paulo, SP, Brasil) foi realizado a terapia de fotobiomodulação com LED vermelho e verde, respectivamente. A luz LED foi irradiada de forma contínua em vermelho (630 ± 10 nm, 300 mW, 9 J/cm² por ponto, 30 segundos) e em verde (520 ± 30 nm, 180 mW, 60 J/cm² por ponto, 120 segundos) em contato com os quatro ângulos da ferida (total: 36 J/cm², 120 segundos e 240 J/cm², 480 segundos), recobrando toda a lesão. O tratamento foi realizado diariamente, exceto nos dias de eutanásia. No grupo controle (CTRL), foi simulado a fototerapia com o equipamento desligado.

Eutanásia e Processamento Histológico

Após o período experimental de cada subgrupo foi realizada a eutanásia dos animais, os quais foram alojados em uma caixa hermeticamente fechada. Nessa caixa foi utilizado algodão embebido com halotano (Tanohalo® 1mL/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil). Dois avaliadores previamente calibrados constataram a morte dos animais por meio da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos.

As lesões foram removidas respeitando uma margem de no mínimo 0,5 cm. Após fixação em formol a 10%, a amostra foi incluída em parafina e submetida a cortes de 3 µm de espessura. Em sequência, os cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina.

Análise Morfológica

Um único avaliador realizou as análises de forma cega. Os cortes histológicos foram

escaneados em imagens digitais de alta resolução (*Leica Biosystems Imaging, IL, USA*) com ampliação de x400 e, posteriormente, visualizados no programa *Aperio ImageScope 12.4.6.5003 (Leica Biosystems Pathology Imaging, IL, USA)*. A contagem dos mastócitos foi realizada em toda a área viável da lesão utilizando a ferramenta *Counter Tool*, de acordo com a metodologia adaptada de Bagheri et al. [9].

Durante a contagem, foram identificados os três tipos de MCTs com base no grau de degranulação das células: MCTs intactos (mastócitos tipo 1 - MCT1); MCTs com grânulos liberados, mas com borda celular intacta (mastócitos tipo 2 – MCT2); MCTs com grande degranulação e desintegração parcial ou completa da borda celular (mastócitos tipo 3 – MCT3). Foi contabilizado a quantidade de cada tipo e o número total de MCT, para cada animal.

Análise Estatística

Os resultados obtidos com as análises morfológicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; *IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Os dados obtidos com a quantificação dos MCTs foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. As comparações das medianas dos MCTs entre os grupos de estudo foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises foram conduzidas considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Influência da fotobiomodulação com LED nos subtipos de MCTs

Os resultados dos estudos de microscopia de luz encontram-se sumarizados na Tabela 1. Os resultados gráficos para os subtipos de MCTs 1 e 2 nos dias 7, 14, 21, 28 e 32 (Fig. 1a,b) e MCTs 3 (Fig. 2a).

Nos dias 7, 14, 21 e 32, o grupo CTRL apresentou quantidades significativamente maiores de MCT1 em relação aos grupos VERM e VERD, exceto no dia 28, em que o grupo CTRL teve números notavelmente maiores de MCT1 em relação a VERD ($p = 0,009$). Para os MCT2, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ou períodos. Quanto aos MCT3, VERM apresentou maiores quantidades quando comparado ao que CTRL e VERD nos dias 7 e 14 ($p = 0,009$). Aos 21 dias, foram constatadas menores

quantidades de MCT3 no grupo CTRL quando comparado aos grupos VERM ($p = 0,009$) e VERD ($p = 0,047$). No dia 32, VERD foi significativamente maior que CTRL ($p = 0,028$).

Influência da fotobiomodulação com LED no número total de MCTs

Os resultados gráficos para número total de MCT nos dias 7, 14, 21, 28 e 32 (Fig. 2b).

Nos dias 14 e 21, VERM apresentou quantidades significativamente e notavelmente maiores de MCTtotais em comparação com CTRL ($p = 0,047$, $p = 0,009$ respectivamente), com exceção do dia 7, em que VERM teve níveis notavelmente maiores em relação ao grupo VERD ($p = 0,009$). No dia 21, tanto VERM quanto VERD tiveram MCTtotais notavelmente e significativamente maiores do que CTRL ($p = 0,009$, $p = 0,047$, respectivamente). Entretanto, nos dias 28 e 32, não foram observadas diferenças significativamente estatísticas em MCTtotais entre os grupos de estudo.

Discussão

Os mecanismos da resposta inflamatória através da fotobiomodulação têm sido minuciosamente investigados. Um recente estudo de nosso grupo ressaltou o papel relevante dos MCTs na regulação das células inflamatórias nos estágios iniciais, especialmente aos 7 dias, com foco em LED azul [12]. A complexa modulação dos MCTs e a interação deles com a amplificação ou redução do processo inflamatório por meio da ativação pela luz destacaram um potencial notável para o envolvimento direto dessas células nesse processo [24]. Dentro desse contexto, evidências emergentes sugerem de maneira consistente que a modulação dos MCTs induzida pela fotobiomodulação tem a capacidade de influenciar o aumento ou a diminuição da resposta inflamatória em queimaduras.

Ao estudarem feridas causadas por laser de CO₂, Melo et al. [11], verificaram aumento de células inflamatórias após 7 dias, e aos 14 e 21 dias verificaram uma diminuição gradativa no grupo LED. Nossos achados estão alinhados aos encontrados por Melo et al. [11], alinhando o achado de aumento dos MCT3 em estágios iniciais do processo inflamatório, e a menor presença de MCT3 nos estágios finais do processo de cicatrização. Neste sentido, os achados corroboram aos encontrados por estudos anteriores [13, 16], que indicam uma atividade anti-inflamatória do LED.

Investigações prévias [20, 18], relataram a redução da degranulação de MCTs. Ao investigarem os efeitos da fotobiomodulação, Kouhkeil et al. [20], em meio condicionado nas

feridas infectadas de ratos diabéticos, observaram a redução de MCTotais e MCT1 no dia 15 e MCT3 no dia 7 em grupos irradiados. Ao estudarem fotobiomodulação em feridas de cicatrização tardia em ratos diabéticos, Ahmadi et al. [18], constataram aumento de MCT1 e diminuição de MCT3 nos grupos irradiados, o que difere dos nossos achados de aumento de MCT3 em grupos irradiados. Nosso achado de diminuição de MCT1 nos grupos irradiados corrobora com o resultado encontrado por Kouhkeil et al. [20]. Esses resultados sugerem que condições sistêmicas podem influenciar a ativação e liberação de grânulos pelos MCTs, afetando os resultados da fotobiomodulação.

Os estudos de Cerqueira et al. [17] e Bagheri et al. [9] proporcionam uma visão abrangente sobre a ação da fotobiomodulação nos MCTs e seu impacto nos processos inflamatórios e de cicatrização. Esses estudos demonstraram que a fotobiomodulação reduziu a degranulação dos MCTs, o que acelerou o processo inflamatório [9, 17]. Em contraste, nosso estudo revelou um aumento significativo da degranulação de mastócitos nos grupos de fotobiomodulação em estágios iniciais de inflamação, com menor presença de degranulação no grupo controle.

Essas diferenças podem ser atribuídas às condições sistêmicas pois, assim como o diabetes, o tratamento quimioterápico mantém o organismo em condição pró-inflamatória crônica influenciando o comportamento dos MCTs [22]. A correlação entre os estudos citados e nossos achados, destaca a complexidade da resposta dos mastócitos à fotobiomodulação e a importância de considerar o contexto sistêmico para compreender seus efeitos moduladores em diferentes estágios da inflamação e cicatrização.

Os resultados desse estudo fornecem uma perspectiva abrangente sobre a ação do LED verde, de forma similar a estudos prévios [10, 21]. O LED verde mostrou potencial para estimular a angiogênese nos estágios iniciais da inflamação, e também influenciar a diferenciação de miofibroblastos em estágios finais do processo de reparação de queimaduras cutâneas de terceiro grau [10, 21]. Nosso achado de maior degranulação de mastócitos do tipo 3 em estágios iniciais está relacionado com a liberação de mediadores pelos mastócitos, como a histamina, que promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, facilitando a migração e proliferação de células envolvidas na angiogênese. Esses eventos iniciais de degranulação dos mastócitos desencadeiam papel crucial, culminando no fornecimento de nutrientes e oxigênio para os miofibroblastos, uma interdependência que contribui para a eficácia do processo de inflamação e de reparação tecidual [6, 7, 9, 22].

No estudo de Alencar Neto [12] foi investigado os efeitos do LED azul na cicatrização de terceiro grau em ratos, e foi relatado uma maior concentração de MCTotais e dos subtipos

MCT1, MCT2 e MCT3 no grupo tratado com esse comprimento de onda em todos os períodos experimentais, exceto aos 28 dias, onde especificamente o número de MCT3 foi superior no grupo controle. Aos 21 dias, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre os grupos de tratamento com LED azul e o grupo controle para os três tipos de MCTs e o número total de MCTs. Aos 32 dias, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), na contagem de MCT1, MCT2 e MCTotais.

Esses achados de Alencar Neto [12] sugerem concordância com os resultados do presente estudo, que também mostrou uma maior presença de MCTs do tipo 3 no grupo de tratamento com fotobiomodulação, utilizando LED vermelho em 21 dias e no grupo de LED verde aos 32 dias. Ambos os estudos indicam uma influência positiva da terapia com fotobiomodulação em MCTs, especialmente no subtipo MCT3, em diferentes tempos de avaliação.

Com base nestas pesquisas e nos nossos achados, sugere-se que o tratamento com LED em diferentes comprimentos de onda pode modular os diferentes subtipos de MCTs, em diferentes momentos do processo inflamatório.

A presença aumentada de MCT3 no grupo tratado com LED verde aos 32 dias pode estar relacionada a uma resposta anti-inflamatória deste comprimento de onda, atuando como regulador do processo. No que se refere ao aumento de mastócitos tipo 3 no grupo tratado com LED vermelho em períodos iniciais da inflamação pode sugerir uma resposta inflamatória mais robusta nesse estágio do processo, essa resposta pode estar associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, que podem influenciar a migração, proliferação e atividade dos fibroblastos, impactando na formação do tecido cicatricial e no processo de reparação tecidual [6, 7, 9, 23].

No entanto, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos moleculares subjacentes e a interação dos mastócitos na cascata de inflamação e sua correlação com condições sistêmicas e células, como os fibroblastos, durante o processo de cicatrização.

A dinâmica da matriz extracelular, notadamente no que concerne às fibras colágenas, desempenha um papel fundamental no processo de cicatrização de queimaduras. Neste contexto, os MCTs uma vez que ativados e em processo de degranulação promovem a liberação de mediadores que exercem influência direta sobre a síntese, remodelação e organização das fibras colágenas [7, 6]. Consequentemente, nosso achado de aumento de MCT3 se alinharia a liberação de fatores de crescimento e citocinas, os quais desempenham papel crucial na atividade fibroblástica e, por conseguinte, afetam a deposição do colágeno na matriz

extracelular.

A identificação dessas diferenças nos subtipos de MCTs e a relação com os tempos e tipos de tratamento fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes frente a queimaduras e outras lesões cutâneas.

Conclusão

Os achados deste estudo sugerem que a terapia com luz LED vermelho e verde pode modular os mastócitos e induzir sua degranulação, levando a uma intensa liberação de mediadores inflamatórios que desempenham papéis diversos no processo inflamatório. Contudo, essa liberação intensa também pode sugerir sintomas inflamatórios acentuados, como vermelhidão, inchaço e dor no local afetado. Futuros estudos com diferentes protocolos são necessários para aprofundar nossa compreensão sobre os mecanismos fotobiomoduladores nos mastócitos em queimaduras de terceiro grau e outras lesões cutâneas, desenvolvendo abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras no tratamento de lesões cutâneas graves.

Conformidade com as normas éticas

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação ética

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB, respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde. Conforme parecer nº 01.001.2012 e seguiu os preceitos da lei brasileira nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e das normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Consentimento informado

O consentimento informado não é necessário, pois este estudo não contém nenhum participante humano.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- [1] Čoma M, Fröhlichová L, Urban L, Zajiček R, Urban T, Szabo P, et al. Molecular changes underlying hypertrophic scarring following burns involve specific deregulations at all wound healing stages (Inflammation, Proliferation and Maturation). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan 18;22(2):897. <https://doi.org/10.3390/ijms22020897>.
- [2] Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* [Internet]. 2014; 7:301–11. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
- [3] Lateef Z, Stuart G, Jones N, Mercer A, Fleming S, Wise L. The cutaneous inflammatory response to thermal burn injury in a murine model. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 Jan 28;20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030538>.
- [4] Andrade A, Brassolatti P, Lourdes G, Julia Risso Parisi, Leal AMO, Andrey M, et al. Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. *Tissue Engineering*. 2020 Apr 12;14(5):673–83. <https://doi.org/10.1002/term.3028>
- [5] Adorno J. Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ) e queimaduras no Brasil. *Revista Brasileira de Queimaduras* [Internet]. 2019;18(1):1–1. <http://www.rbqueimaduras.com.br/details/451/pt-BR/sociedade-brasileira-de-queimaduras--sbq--e-queimaduras-no-brasil>.
- [6] Atiakshin D, Soboleva M, Nikityuk D, Alexeeva N, Klochkova S, Kostin A, et al. Mast cells in regeneration of the skin in burn wound with special emphasis on molecular hydrogen effect. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Aug 6];16(3):348. <https://doi.org/10.3390/ph16030348>.
- [7] Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A review of the contribution of mast cells in wound healing: Involved molecular and cellular mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019 Feb 7;58(3):298–312. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>.
- [8] Plum T, Wang X, Rettel M, Krijgsveld J, Feyerabend TB, Rodewald HR. Human mast cell

proteome reveals unique lineage, putative functions, and structural basis for cell ablation. *Immunity*. 2020Feb;52(2):404-416.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.012>.

[9] Bagheri M, Amini A, Abdollahifar MA, Ghoreishi SK, Piryaei A, Pouriran R, et al. 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*. 2018 Aug;36(8):415–23. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4453>.

[10] Simões TMS, Fernandes Neto J de A, de Oliveira TKB, Nonaka CFW, Catão MHCV. Photobiomodulation of red and green lights in the repair process of third-degree skin burns. *Lasers in Medical Science*. 2019 Mar 28;35(1):51–61. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02776-7>.

[11] Melo S, Leandro Procópio Alves, Adriana Barrinha Fernandes, Henrique Cunha Carvalho, José C, Egberto Munin, et al. LED phototherapy in full-thickness burns induced by CO2 laser in rats skin. *Lasers in Medical Science*. 2018 Apr 27;33(7):1537–47. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2515-8>.

[12] Alencar Neto, J.F de. Efeitos fotobiomoduladores do diodo emissor de luz azul na cicatrização de queimaduras cutâneas. *tedebcuepbedubr* [Internet]. 2021 Sep 16 [cited 2023 Aug 8]; Available from: <https://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/3945>

[13] Catão MHCV, Nonaka CFW, de Albuquerque RLC, Bento PM, de Oliveira Costa R. 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 in Medical Science*. 2014 Nov 13;30(1):421–8. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1687-0>.

[14] Oliveira Sampaio SCP, de C. Monteiro JS, Cangussú MCT, Pires Santos GM, dos Santos MAV, dos Santos JN, et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers in Medical Science*. 2012 Jul 20;28(3):799–806. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1161-9>.

[15] Neves, S.M.V., Nicolau, R.A., Filho, A.L.M.M. et al. Digital photogrammetry and

histomorphometric assessment of the effect of non-coherent light (light-emitting diode) therapy ($\lambda 640 \pm 20$ nm) on the repair of third-degree burns in rats. *Lasers Med Sci* 29, 203–212 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1312-7>

[16] Catão MHCV, Costa RO, Nonaka CFW, Junior RLCA, Costa IRRS. Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. *Burns*. 2016 Mar;42(2):392–6. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.07.003>.

[17] Cerqueira S, Livia Andrade Vitória, Silva, Tânia Tavares Rodriguez, Cristina M, Maria L. Expression and degranulation of mast cells in laser photobiomodulated mucositis chemically induced: pilot study in hamsters. 2023 Jan 3;38(1). <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03698-7>.

[18] Ahmadi H, Bayat M, Amini A, Atarodalsadat Mostafavinia, Roohollah Ebrahimipour-Malekshah, Rouhollah Gazor, et al. 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. 2021 Sep 2;37(3):1593–604. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03408-9>.

[19] Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2020 Mar 28;154(1):21–40. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01875-9>.

[20] Kouhkheil R, Fridoni M, Abdollahifar MA, Amini A, Bayat S, Ghoreishi SK, et al. Impact of photobiomodulation and condition medium on mast cell counts, degranulation, and wound strength in infected skin wound healing of diabetic rats. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2019 Nov 1;37(11):706–14. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4691>.

[21] Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair and Regeneration*. 2012 Mar;20(2):226–35. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x>

[22] Kleckner IR, Kamen C, Cole C, Fung C, Heckler CE, Guido JJ, et al. Effects of exercise on inflammation in patients receiving chemotherapy: a nationwide NCORP randomized

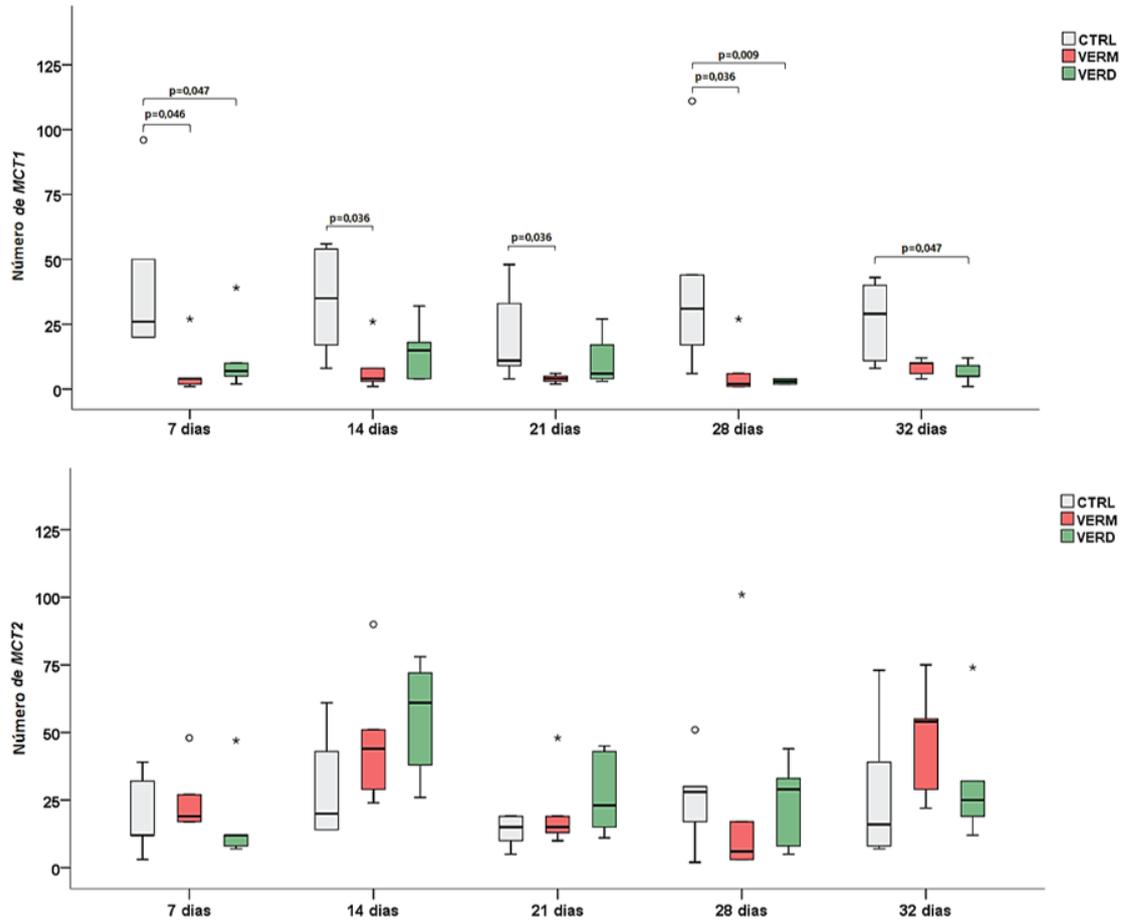
clinical trial. *Supportive Care in Cancer*. 2019 Apr 2;27(12):4615–25.
<https://doi.org/10.1007/s00520-019-04772-7>.

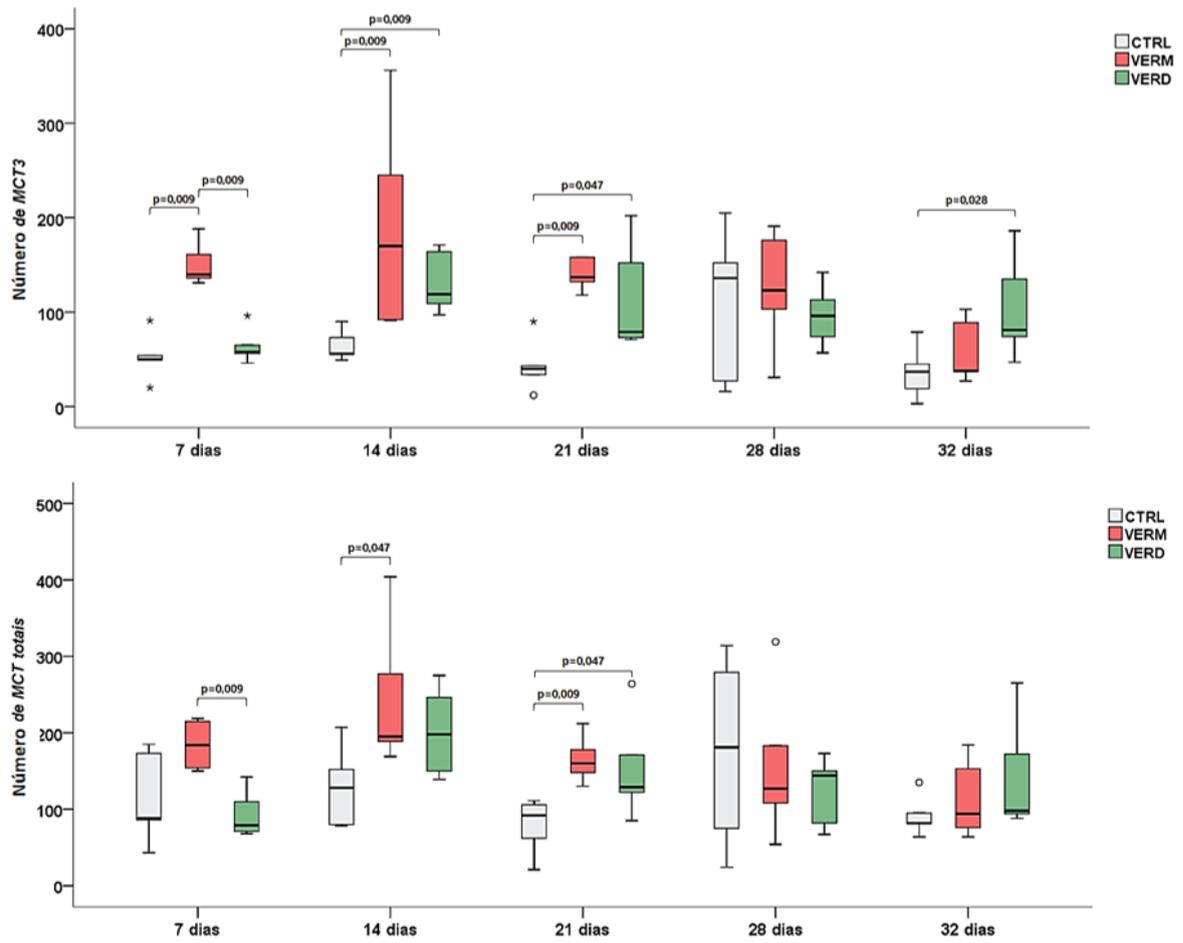
[23] Farias LG de. Avaliação da fotobiomodulação na reparação de feridas cutâneas: Estudo clínico e histológico em ratos. *tedebcuepbedubr* [Internet]. 2022 Aug 10 [cited 2023 Aug 8]; Available from: <https://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/4580>

Tabela 1 Análise da quantidade de mastócitos subtipos 1, 2, 3 e totais em grupos experimentais, em diferentes tempos de avaliação (7, 14, 21, 28 e 32 dias após a queimadura).

Variável	Mastócito Tipo 1 Md (mín - máx)	Mastócito Tipo 2 Md (mín - máx)	Mastócito Tipo 3 Md (mín - máx)	Mastócito Totais Md (mín - máx)
7 Dias				
Controle	26,0 (20,0 - 96,0)	12,0 (3,0 - 39,0)	50,0 (20,0 - 91,0)	88,0 (43,0 - 185,0)
Vermelho	4,0 (1,0 - 27,0)	19,0 (17,0 - 48,0)	140,0 (131,0 - 188,0)	184,0 (150,0 - 219,0)
Verde	7,0 (2,0 - 39,0)	12,0 (7,0 - 47,0)	58,0 (46,0-96,0)	79,0 (68,0 - 142,0)
14 Dias				
Controle	35,0 (8,0 - 56,0)	20,0 (14,0 - 61,0)	56,0 (49,0 - 90,0)	128,0 (78,0 - 207,0)
Vermelho	4,0 (1,0 - 26,0)	44,0 (24,0 - 90,0)	170,0 (91,0 - 356,0)	195,0 (169,0 - 404,0)
Verde	15,0 (4,0 - 32,0)	61,0 (26,0 - 78,0)	119,0 (97,0 - 171,0)	198,0 (139,0 - 275,0)
21 Dias				
Controle	11,0 (4,0 - 48,0)	15,0 (5,0 - 19,0)	40,0 (12,0 - 90,0)	92,0 (21,0 - 111,0)
Vermelho	4,0 (2,0 - 6,0)	15,0 (10,0 - 48,0)	137,0 (118,0 - 158,0)	160,0 (130,0 - 212,0)
Verde	6,0 (3,0 - 27,0)	23,0 (11,0 - 45,0)	79,0 (71,0 - 202,0)	129,0 (85,0 - 264,0)
28 Dias				
Controle	31,0 (6,0 - 111,0)	28,0 (2,0 - 51,0)	136,0 (16,0 - 205,0)	181,0 (24,0 - 314,0)
Vermelho	2,0 (1,0 - 27,0)	6,0 (3,0 - 101,0)	123,0 (31,0 - 191,0)	127,0 (54,0 - 319,0)
Verde	3,0 (2,0 - 4,0)	29,0 (5,0 - 44,0)	96,0 (57,0 - 142,0)	144,0 (67,0 - 173,0)
32 Dias				
Controle	29,0 (8,0 - 43,0)	16,0 (7,0 - 73,0)	37,0 (3,0 - 79,0)	82,0 (64,0 - 135,0)
Vermelho	10,0 (4,0 - 12,0)	54,0 (22,0 - 75,0)	38,0 (27,0 - 103,0)	94,0 (64,0 - 184,0)
Verde	5,0 (1,0 - 12,0)	25,0 (12,0 - 74,0)	81,0 (47,0 - 186,0)	98,0 (88,0 - 265,0)

MD: Mediana.





5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo sugerem que a terapia com luz LED vermelha e verde pode modular os MCTs e induzir sua degranulação, promovendo um aumento na concentração de MCT3, levando a uma intensa liberação de mediadores inflamatórios e compostos bioquímicos. Esses mediadores desempenham papéis diversos no processo pró-inflamatório, incluindo a defesa do organismo contra lesões e infecções, o que pode sugerir uma boa resposta em estágios iniciais de inflamação.

Contudo, essa liberação intensa também pode sugerir sintomas inflamatórios mais acentuados, como vermelhidão, inchaço e dor no local afetado. Cabe destacar que são poucas as pesquisas publicadas até o presente momento sobre o tema, que liguem a aplicação de terapias de fotobiomodulação aos efeitos provocados nos mastócitos.

Estudos mais aprofundados em MCTS, que abordem não apenas diferentes protocolos e combinações de terapias, mas a relação do processo de fotobiomodulação com os mediadores liberados por estas células, ou a cadeia de relações com outros tipos celulares intimamente envolvidos neste processo são necessários para uma melhor e mais completa compreensão sobre os mecanismos fotobiomoduladores nos mastócitos em queimaduras de terceiro grau e outras lesões cutâneas, desenvolvendo abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras no tratamento de lesões cutâneas graves.

REFERÊNCIAS¹

- ADORNO, J. Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ) e queimaduras no Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 18, n. 1, p. 1–1, 2019.
- ANDRADE, A. et al. Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 5, p. 673–683, 12 abr. 2020. <https://doi.org/10.1002/term.3028>.
- AHMADI, H. et al. 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 Med Sci**, v. 37, n. 3, p. 1593–1604, 2 set. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03408-9>.
- ATIAKSHIN, D. et al. Mast Cells in Regeneration of the Skin in Burn Wound with Special Emphasis on Molecular Hydrogen Effect. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 348, 1 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ph16030348>.
- ATIAKSHIN, D.; BUCHWALOW, I.; TIEMANN, M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 1, p. 21–40, 28 mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01875-9>.
- AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 32, n. 1, p. 41–52, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126803/>.
- BAGHERI, M. et al. 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**, v. 36, n. 8, p. 415–423, ago. 2018. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4453>.
- BRASSOLATTI, P. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 4, p. 313–320, 8 fev. 2016. <https://doi.org/10.1002/jemt.22632>.

BURGESS, M. et al. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3073, 29 set. 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11193073>.

CATÃO, M. H. C. V. et al. Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. **Burns**, v. 42, n. 2, p. 392–396, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.07.003>.

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 in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 421–428, 13 nov. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1687-0>.

CERQUEIRA, S. et al. Expression and degranulation of mast cells in laser photobiomodulated mucositis chemo-induced: pilot study in hamsters. **Lasers Med Sci**, 38, n. 1, 3 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03698-7>.

ČOMA, M. et al. Molecular Changes Underlying Hypertrophic Scarring Following Burns Involve Specific Deregulations at All Wound Healing Stages (Inflammation, Proliferation and Maturation). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 897, 18 jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22020897>.

DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 301–11, 2014. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, maio 2016. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>.

DE SOUSA, A. P. C. et al. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 981–987, 25 ago. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1187-z>.

DOMPE, C. et al. Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1724, 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9061724>.

FARIAS, L. G. DE; CATÃO, M. H. C. DE V. Uso do laser de baixa intensidade e LED no processo de cicatrização de feridas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e55811427722, 26 mar. 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27722>.

FERNANDES NETO, J. A.; NONAKA, C. F. W.; DE VASCONCELOS CATÃO, M. H. C. Effect of blue LED on the healing process of third-degree skin burns: clinical and histological evaluation. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 4, p. 721–728, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2647-x>.

HADIS, M. A. et al. Development and application of LED arrays for use in phototherapy research. **Journal of Biophotonics**, v. 10, n. 11, p. 1514–1525, 6 fev. 2017. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600273>.

KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, n. 3, p. 298–312, 7 fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>.

LATEEF, Z. et al. The Cutaneous Inflammatory Response to Thermal Burn Injury in a Murine Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 28 jan. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20030538>.

MELO, S. et al. LED phototherapy in full-thickness burns induced by CO₂ laser in rats skin. **Lasers Med Sci**, v. 33, n. 7, p. 1537–1547, 27 abr. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2515-8>.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. DA. A standard burn model using rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 14, n. 4, out. 1999. <https://doi.org/10.1590/S0102-86501999000400009>.

NEVES, S.M.V et al. Digital photogrammetry and histomorphometric assessment of the effect of non-coherent light (light-emitting diode) therapy ($\lambda 640 \pm 20$ nm) on the repair of third-degree burns in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 203–212, 13 abr. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1312-7>.

- OLIVEIRA SAMPAIO, S. C. P. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 799–806, 20 jul. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1161-9>.
- ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **Journal of Wound Care**, v. 26, n. 1, p. 5–19, 2 jan. 2017. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.1.5>.
- PARAGUASSÚ, G. M. et al. Effects of LED phototherapy on relative wound contraction and reepithelialization during tissue repair in hypothyroid rats: morphometric and histological study. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 773–779, 24 ago. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1419-x>.
- PLUM, T. et al. Human Mast Cell Proteome Reveals Unique Lineage, Putative Functions, and Structural Basis for Cell Ablation. **Immunity**, v. 52, n. 2, p. 404-416.e5, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.012>.
- SILVEIRA, P. C. L. et al. Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1395–1404, 1 ago. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0371-x>.
- SIMÕES, T. M. S. et al. Photobiomodulation of red and green lights in the repair process of third-degree skin burns. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 1, p. 51–61, 28 mar. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02776-7>.
- WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478–494, 6 jun. 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3690>.
- WILGUS, T. A.; WULFF, B. C. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 4, p. 356–365, abr. 2014. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0457>.
- YEGANEH, P. M.; TAHMASEBI, S.; ESMAEILZADEH, A. Cellular and biological factors involved in healing wounds and burns and treatment options in tissue

engineering. **Regenerative Medicine**, v. 17, n. 6, p. 401–418, jun. 2022.
<https://doi.org/10.2217/rme-2022-0029>.

¹Conforme ABNT NBR 10520:2023

ANEXO A. Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



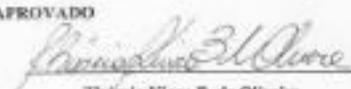
PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 6809092016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 09/09/2016

1. Pesquisador Responsável: Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
 Título do Projeto: AÇÃO DA FOTOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM PELE: ANÁLISE CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.

2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em 09 / 09 / 2016.

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

Parecer Final: APROVADO


Thércia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora da CEUA-CESED



Av. Brasil, Agência Reguladora, 1401 - 14000
 070 18100-000 - Curitiba-Paraná, PR - Fone: 051 3111.0000
 www.ceced.br | info@ceced.br | atendimento@ceced.br
 CEP: 81.198-000/0001-40

ANEXO B. Normas de submissão de trabalhos ao periódico *Lasers in Medical Science*.

Lasers in Medical Science

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

Lasers in Medical Science (LIMS) has established itself as the leading international journal in the rapidly expanding field of medical and dental applications of lasers and light. It provides a forum for the publication of papers on the technical, experimental, and clinical aspects of the use of medical lasers, including lasers in surgery, endoscopy, angioplasty, hyperthermia of tumors, and photodynamic therapy. In addition to medical laser applications, LIMS presents high-quality manuscripts on a wide range of dental topics, including aesthetic dentistry, endodontics, orthodontics, and prosthodontics. The journal publishes articles on the medical and dental applications of novel laser technologies, light delivery systems, sensors to monitor laser effects, basic laser-tissue interactions, and the modeling of laser-tissue interactions. Beyond laser applications, LIMS features articles relating to the use of non-laser light- tissue interactions.

Instructions for authors Types of papers

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

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co- authors, if any, as well as by the

responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

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

Online Submission

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

Title Page

The title page should include:

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

Abstract

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

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

Keywords

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

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

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

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

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

Scientific style

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

Units and abbreviations

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

References

Citation

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

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

Reference list

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

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-0080955-8

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

will also

be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J MolMed*. 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 abovementioned 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.

