JULIANA RODRIGUES DE CASTRO

**Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa
potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos
não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina**

São Paulo

2018

JULIANA RODRIGUES DE CASTRO

Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Castro, Juliana Rodrigues de.

Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina/ Juliana Rodrigues de Castro ; orientador Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2018.

123 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia oral -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Reparo tecidual. 2. Laser. 3. Terapia fotobiomoduladora. 4. Diabetes Mellitus. I. Gonçalves, Alyne Simões. II. Título.

CastroJRC.Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: //2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho...

... À DEUS, pelo seu amor e pela sua misericórdia, sempre guiando meus passos e meus pensamentos.

... Ao meu pai, pelo seu jeito único de me acalmar e de me aconselhar, que mesmo hoje se faz MUITO presente em minha vida.

... À minha mãe, meu exemplo de força e superação, que tanto me incentivou e me apoiou em todas as minhas etapas e escolhas da minha vida

... Ao meu marido, pelo sua paciência, pelo seu amor e amizade e companheirismo, me ensinando ser cada dia melhor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me presentear com a vida, e nela poder viver momentos tão especiais ao lado da família e dos amigos mais maravilhosos que existem!

Ao meu pai, José Eduardo (*in memoriam*), meu fã número 1! Que sempre acalmava meu coração nos momentos difíceis e que se orgulhava exageradamente de cada conquista minha. Pai, sinto muito sua falta, mas sei que você está sempre comigo!

À minha mãe, Sonia, por me amar e me apoiar de maneira incondicional, sempre escutando minhas vontades e meus sonhos, e me guiando para o caminho certo. Mãe, hoje, eu sou o que sou por causa de você e por você! Te amo!

À minha irmã, Ana Paula, pelo seu amor, pelo seu apoio, pela sua coragem e disposição! Tenho muito orgulho ser sua irmã e ver quem você se tornou, uma pessoa de respeito e ética inigualável e uma profissional altamente competente! Te amo!

Ao meu marido e melhor amigo, Felipe, que viveu intensamente toda minha trajetória na FOUSP, sem ser dentista! Sempre com muita compreensão, companheirismo e paciência. Tito, muito obrigada por me amar, por me incentivar, por compreender e por me acompanhar em todos os momentos, inclusive em inúmeros domingos e feriados no biotério! Você é uma pessoa de muita luz, a qual eu admiro e amo MUITO! À família Fanchini, Marcelo, Valéria e Bruna, pelo apoio e por sempre de receber com muito amor!

À minha orientadora, Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, pela oportunidade em trabalhar no laboratório, pelo seu prazer em transmitir seus conhecimentos, por todos os conselhos e broncas, que me fizeram enxergar as situações de maneira diferente e me fizeram crescer muito, tanto profissionalmente, como pessoalmente! Profa. sou muito grata a você e a tenho como grade exemplo pessoal e profissional! Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves, meu eterno professor de histologia, que me indicou para trabalhar com pesquisa, e me recebeu tão bem no laboratório, sempre me ajudando e ensinando muito, de maneira única e exemplar. Prof., muito obrigada pela oportunidade e pela sua disposição e alegria em ensinar!

Ao Prof. Dr. Rafael YagüeBallester, pela sua sabedoria em educar, nos fazendo exercitar a maneira de pensar, e nos contagiando com a seu entusiasmo em busca de conhecimento sempre em função da verdade!

Aos professores do Laboratório de Bioquímica oral, Prof. Dr. José Nicolau, um grande mestre e exemplo profissional, e ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, de grande conhecimento e alegria contagiante, sempre dispostos a me ajudar e me ensinar!

Aos Professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci, Prof. Dr. Igor Studart Medeiros, Profa Dra. Josete Barbosa Cruz Meira, Prof. Dr. Leonardo Eloy Rodrigues Filho, Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso, Prof. Dr. Paulo Francisco Cesar, Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga e Prof. Dr. Walter Gomes Miranda Junior, pela convivência em todos esses anos! Vocês são profissionais admiráveis e foram muito importantes para minha formação!

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Oral, Ana Romero, Flavinha, Luana, Claudia, Cintia, Gabi S., e em especial para o Filipi e para Gabi M. que contribuíram muito para a execução desse trabalho, sempre com muita responsabilidade e com muito carinho. Foi muito importante tê-los comigo nessa jornada!

Aos meus amados da USP, Yvette, Ezequias, Mariana, Sandra, Mariel e Livia! Muito obrigada pela amizade, pelos conselhos e pelas risadas. Onde quer que o mundo e o sucesso os levem, vocês estarão no meu coração! Vocês são pessoas e profissionais incríveis! Torço muito pelo sucesso de cada vocês!

As minhas amigas do coração, Taci, Ana Flávia, Maria, Livia, Marcela, pela amizade e união em todos esses anos, e por serem minhas amigas! A amizade que temos é muito linda e especial pra mim, é muito curioso como somos tão diferentes e tão iguais ao mesmo tempo.... nos conhecemos numa época onde mal sabíamos como seria nossas profissões e hoje concluo uma das etapas mais importantes da minha carreira, na qual o apoio e a amizade de vocês foi muito importante pra mim! Muito obrigada por tudo!! Amo muito vocês!

Aos meus eternos VIPs, Marcão, Ligia, Karina G, Marcelo, Karina P., Bruno, Francis, Chris, por serem tão companheiros e presentes em minha vida! Obrigada por deixarem meus dias mais alegres e obrigada pelos ombros amigos quando precisei! Agradeço a Deus por Ele ter colocado pessoas tão especiais na minha vida como vocês!

Aos técnicos dos laboratórios Elisângela, Douglas e Antônio, por todo suporte e ajuda! Vocês foram fundamentais para a execução desse trabalho e também na minha formação como pesquisadora. Muito Obrigada!

As secretárias Rosinha e Eli, por serem tão competentes, amáveis, e sempre dispostas a ajudar a todos (e me ajudaram MUITO)

A toda família LELO e grupo Mucosite, que se fizeram tão presente durante a minha formação como pesquisadora e professora. Muito Obrigada!

A CAPES pela minha bolsa de Doutorado

A FAPESP pelo auxílio financeiro 2014/21214-1 que permitiu que este projeto se tornasse realidade.

A Universidade de São Paulo, por permitir a realização deste estudo.

A todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste sonho,
muito obrigada.

"Eu tentei 99 vezes e falhei, na centésima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser vitoriosa".

Albert Einsten

"Por acaso você acha que a luz só existe quando você está vendo? Não, é você que não existiria se a luz não o visse".

Schopenhauer

RESUMO

Castro JRC. Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina[tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida

Cada vez mais a terapia fotobiomoduladora (PBMT) tem sido amplamente utilizada com o intuito de acelerar o processo de reparo tecidual, principalmente em algumas condições sistêmicas, como é o caso da *Diabete Mellitus*. Entretanto, ainda poucos trabalhos tem o objetivo de analisar os parâmetros dosimétricos que podem ser utilizados com o intuito de se estabelecer a melhor dose que possa ser entregue ao tecido. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, através de análises macroscópicas da lesão, histológicas e biomecânicas, o processo de reparo tecidual frente à terapia fotobiomoduladora, levando em consideração a dose, frequência e modo de entrega da energia. Para isso, foram utilizados 282 ratos Wistar, divididos em 2 grandes grupos: diabéticos e não diabéticos. Para a indução do diabetes, foi injetado, intraperitonealmente, uma dose de 60 mg/kg de Estreptozotocina, diluída em tampão Citrato de Sódio 0,1 M, pH 4. Após 72 h da injeção, os animais permaneceram em jejum por 12 horas, e com auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek Performa®) a glicemia desses animais foi aferida a partir do sangue da veia caudal, para confirmar o quadro de diabetes. Os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL de sangue foram considerados para o grupo dos animais diabéticos. No grupo não-diabético, foi injetado, da mesma maneira, apenas o veículo, na mesma dose. Após 15 dias da divisão dos animais em diabéticos e não diabéticos, os foi realizada de acordo com a dose, frequência e modo de entrega da energia, como segue: grupo controle e diabético (sem irradiação); grupos irradiados uma única vez: L1 e L1D (não diabético e diabético irradiados com 1 ponto de 10J/cm², respectivamente), L2 e L2D (não diabético e diabético irradiados com 5 pontos de 10J/cm², respectivamente), L3 e L3D (não diabético e diabético irradiados ponto central de 50J/cm², respectivamente); grupos irradiados nos dias 1, 2, 4, 6 do experimento: L4 e L4D (não diabético e diabético irradiados com 1 ponto de 10J/cm², respectivamente), L5 e L5D (não diabético e diabético irradiados com 5 pontos de

10J/cm², respectivamente), L6 e L6D (não diabético e diabético irradiados com 1 ponto de 50J/cm², respectivamente). Foi utilizado o PhotonLase III-DMC®, λ 660nm, potência de 40mW. Houve acompanhamento fotográfico das lesões durante o experimento, para posterior análise macroscópica da lesão. Após 7, 10 e 14 dias, da excisão tecidual, os animais foram anestesiados, eutanasiados, e o dorso removido para análises de re-epitelização e infiltrado inflamatório através de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE); análise da área de formação de colágeno, através da colorações com Tricrômico de Mallory; análise da imunexpressão da citoqueratina 10 no epitélio neo-formado por imunohistoquímica, e para análise da força de tensão suportada pelo tecido imediatamente antes da sua ruptura, através de ensaios biomecânicos. Os resultados sugerem que independente da condição sistêmica do animal, os fatores dosimétricos influenciaram no tempo de reparo tecidual dos animais, onde a maior frequência de irradiação, com doses menores e mais distribuídas na lesão, acarretou em um reparo clínico mais rápido, maior expressão de citoqueratina 10 e em uma maior resistência a ruptura desse tecido. Além disso, para os animais diabéticos, novamente a maior frequência de irradiação, com doses menores e mais distribuídas no tecido, resultou em uma diminuição do processo inflamatório, possibilitando uma maior produção e remodelação de colágeno, e também em um processo de re-epitelização e maturação mais rápida do epitélio, resultando, em um reparo tecidual mais acelerado. Sendo assim, podemos concluir que uma maior frequência de irradiação e uma melhor distribuição da energia no tecido resultam em um processo de reparo tecidual, de feridas excisionais realizadas no dorso de ratos diabéticos e não diabéticos, mais rápido.

Palavras-chave: Reparo Tecidual. Laser. Terapia fotobiomoduladora. Diabetes.

ABSTRACT

Castro JRC. Comparative study of different low power laser irradiation protocols for tissue repair of excisions performed on the back of non-diabetic and diabetic rats induced by streptozotocin[thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2017.Versão Corrigida.

Photobiomodulation therapy (PBMT) has been widely used in order to accelerate the process of tissue repair, especially in some systemic conditions, such as Diabetes Mellitus. However, just a few studies have the objective of analyzing the dosimetric parameters that can be used in order to establish the best laser protocol that can be delivered to the tissue. Therefore, this study aimed to evaluate, through clinical, histological and biomechanical analyzes, the process of tissue repair after PBMT, considering the dose, frequency and mode of delivery of the energy. For this, 282 Wistar rats were used, divided into 2 groups: diabetic and non-diabetic. For the induction of diabetes, a dose of 60 mg / kg of Streptozotocin, diluted in 0.1 M Sodium Citrate buffer, pH 4, was injected intraperitoneally. After 72 h of the injection, the glycemia of the fasted animals was measured, using a glucometer (Accu-Chek Performa®). Those animals presenting a glycaemia of 250 mg / dL or higher were considered diabetic animals. After 15 days of the induction of diabetes, the animals were subdivided according to the dose, frequency and mode of energy delivery, as follows: control group and diabetic (without irradiation); L1 and L1D (non-diabetic and diabetic irradiated with 1 point of 10J/cm², respectively), L3 and L3D (non-diabetic and diabetic irradiated with 5 points of 10J/cm², respectively), non-diabetic and diabetic irradiated central point of 50J/cm², respectively); L4 and L4D (non-diabetic and diabetic irradiated with a point of 10J/cm², respectively), L5 and L5D (non-diabetic and diabetic irradiated with 5 points of 10J/cm², respectively), L6 and L6D (non-diabetic and diabetic irradiated with 1 point of 50J/cm², respectively). Photon Lase III-DMC®, λ 660nm, power of 40mW was used. There was photographic follow-up of the lesions during the experiment, for later clinical analysis. After 7, 10 and 14 days of tissue excision, the animals were anesthetized, euthanized, and the samples removed for analyzes of re-epithelialization and inflammatory infiltrate; collagen formation, cytokeratin 10 immunoexpression and analysis of the tensile strength

analysis. The results suggest that, regardless of the systemic condition of the animal, the dosimetric factors influenced the tissue repair time. Higher frequency of irradiation with lower and more distributed doses in the lesion resulted in a faster clinical repair, higher expression of cytokeratin 10 and greater tissue resistance to rupture. Furthermore, for diabetic animals, higher frequency of irradiation with lower and more distributed doses in the tissue also resulted in a decrease of inflammatory process, greater production and remodeling of collagen, better process of re-epithelization and maturation of the epithelium, resulting in a faster wound healing process. Thus, we can conclude that a higher frequency of irradiation and a better distribution of energy in the tissue result in a faster tissue repair process.

Keywords: Tissue Repair. Laser. Photobiomodulatory therapy. Diabetes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Fluxograma com todas as etapas experimentais.....	56
Figura 4.2 - Organograma referente às análises histológicas (para coloração com hematoxilina e Eosina, coloração com o Tricrômico de Mallory e para Imunohistoquímica), mostrando a distribuição dos animais nos diferentes grupos	57
Tabela 4.1 – Parâmetros de irradiação usados nos diferentes grupos	61
Figura 4.3 - Organograma referente à análise biomecânica mostrando a distribuição dos grupos de animais	57
Figura 4.4 – (a) Fotografia após a tricotomia do dorso com o posicionamento do molde para determinar o local que será realizado a excisão com <i>punch</i> . (b) Fotografia após a excisão tecidual com <i>punch</i> e com as marcações em nanquim. (c) Fotografia do posicionamento da ferida após 10 dias da excisão tecidual, mostrando a relação da mesma com as marcações em nanquim. (d) Fotografia da ferida após 10 dias da excisão tecidual, mostrando sua relação com as marcas em nanquim e o molde, padronizando o local da ferida.....	58
Figura 4.5 – Representaçãodo modo de irradiação (distribuição dos pontos de irradiação) para os grupos em (a) L1, L1D, L4 e L4D, (b) L2, L2D, L5 e L5D; e em (c) L3, L3D, L6 e L6D	60
Figura 4.6 – (A) Captura da imagemextraída do programa Image J®, mostrando a delimitação da área inicial da excisão. (B) Figura extraída do programa Image J®, mostrando a delimitação da área final da excisão.....	63
Figura 4.7 – Fotomicrografia demonstrado a o diâmetro da ferida (verde) e a distância da ferida que está recoberta por epitélio (azul)	64
Figura 4.8 – (A) Demostraçãoda marcação da área total do epitélio, (B) área do lado esquerdo do tecido corada em azul, (C) área do lado direito do tecido corada em azul.....	66

Figura 4.9 – Captura das imagens extraídas do programa ImageJ® mostrando todos os passos da análise por deconvolução de cor 68

Figura 4.10 – Sequência dos passos executados para o teste biomecânico. (A) Dispositivo produzido para o recorte em ampulheta, (B) Obtenção da amostra utilizando o molde para padronização das amostras, (C) posicionamento do instrumento para recorte em ampulheta do tecido, (D) tecido recordado em modelo de ampulheta, (E) tecido posicionado na garra para execução do teste de tensão, e em (F) tecido rompido pelo teste de tensão mecânica 69

Gráfico 5.1 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de reparo tecidual (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas) (* significam os *outliers* do grupo). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (letras maiúsculas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$).72

Figura 5.1 – Fotografias dos grupos de animais não diabéticos nos tempos: iniciais e com 7, 10 e 14 dias após a excisão tecidual 73

Gráfico 5.2 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de re-epitelização (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$). 75

Figura 5.2 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 40X 77

Gráfico 5.3 – Mediana e valores máximos e mínimos para o escore de infiltrado inflamatório (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$). 76

Figura 5.3 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento . Aumento de 40X 77

Figura 5.4 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 40X 77

Gráfico 5.4 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de formação de colágeno (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$) 78

Figura 5.5 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento . Aumento de 40X 79

Gráfico 5.5 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de expressão da citoqueratina 10 (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$) 81

Figura 5.6 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento . Aumento de 40X 79

Gráfico 5.6 – Média e desvio padrão da força de tração (N) (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$) 83

Figura 5.7 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento . Aumento de 40X 79

Gráfico 5.7 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de reparo tecidual (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas) (os * significam os outliers do grupo) . Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (letras maiúsculas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$). 85

Figura 5.8 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 400X..... 82

Gráfico 5.8 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de re-epitelização (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de kruskall-wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p<0.05$)..... 88

Figura 5.9 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 400X..... 82

Gráfico 5.9 – Mediana e valores máximos e mínimos para o escore de infiltrado inflamatório (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de kruskall-wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p<0.05$)..... 89

Figura 5.10 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 400X..... 82

Gráfico 5.10 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de formação de colágeno (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p<0.05$).92

Figura 5.11 – Fotografias dos grupos de animais diabéticos nos tempos: iniciais e com 7, 10 e 14 dias após a excisão tecidual 86

Gráfico 5.11 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de expressão da citoqueratina 10 (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p<0.05$)..... 94

Figura 5.12 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento .
Aumento de 40X 90

Gráfico 5.12 – Média e desvio padrão da força de tração (N) (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)..... 96

Figura 5.13 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento .
Aumento de 40X 90

Figura 5.14 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento .
Aumento de 40X 90

Figura 5.15 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento . Aumento de 40X..... 93

Figura 5.16 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento . Aumento de 40X 93

Figura 5.17 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento . Aumento de 40X 93

Figura 5.18 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento . Aumento de 400X 95

Figura 5.19 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento . Aumento de 400X 95

Figura 5.20 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento . Aumento de 400X 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
5-FU	5-fluorouracil
AGEs	<i>Advanced glycation end-productis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA –FOUSP	Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
CK	Citoqueratina
CK10	Citoqueratina 10
CK14	Citoqueratina 14
cm	Centímetro
cm ²	Centímetros quadrados
COX-2	Ciclooxigenase-2
dL	decilitro
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	<i>Epidermal growth fator</i>
FGF	<i>Fibroblast growth fator</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
h	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
He-Ne	Hélio-Neônio
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18

IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
KGF-1	<i>Keratinocyte growth fator 1</i>
KGF-2	<i>Keratinocyte growth fator 2</i>
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LLLT	<i>Low Level Laser Therapy</i>
M	Molar
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
mg	miligrama
min	Minuto
ml/Kg	Mililitros por kilograma
mm	milímetros
MMP-9	Matrix metallopeptidase 9
mRNA	Messenger RNA
mW	Miliwatts
N	Newton
NF-kappa b	<i>Nuclear Factor kappa beta</i>
nm	Nanômetros
PBMT	<i>Photobiomodulation therapy</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PG2	Prostaglandinas E2
pH	Potencial hidrogênionico
RAGEs	<i>Receptor advanced glycation end-productis</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
s	Segundos
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>

TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TM	Tricrômico de Mallory
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i>
X	Vezeas
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	PELE	31
2.2	REPARO TECIDUAL.....	34
2.3	DIABETES MELLITUS	37
2.4	REPARO TECIDUAL NO DIABETES MELLITUS	40
2.5	TERAPIA FOTOBIMODULADORA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (PHOTOBIMODULATION THERAPY, PBMT)	43
2.6	PBMT COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL	45
2.7	PBMT COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL NO DIABETES	48
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	COMITÊ DE ÉTICA	55
4.2	ANIMAIS.....	55
4.3	FERIDA CIRÚRGICA	58
4.4	TERAPIA FOTOBIMODULADORA (DO INGLÊS, <i>PHOTOBIMODULATION THERAPY, PBMT</i>).....	59
4.5	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	62
4.6	ANÁLISE MACROSCÓPICA DA LESÃO	62
4.7	ANÁLISES HISTO-MORFOLÓGICAS.....	63
4.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO...64	
4.9	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOQUERATINA 10	66
4.10	ANÁLISE BIOMECÂNICA	68
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS	71
5.1	ANIMAIS NÃO DIABÉTICOS	71
5.1.1	Análises Macroscópicas da lesão.....	71

5.1.2	Análises Histo-morfológicas	74
5.1.3	Análise Histológica para quantificação de colágeno.....	78
5.1.4	Análise Imunohistoquímica para quantificação de Citoqueratina 10	80
5.1.5	Análise Biomecânica	83
5.2	ANIMAIS DIABÉTICOS	84
5.2.1	Análises Macroscópicas da lesão.....	84
5.2.2	Análises Histo-morfológicas	86
5.2.3	Análise Histológica para quantificação de colágeno.....	91
5.2.4	Análise Imunohistoquímica para quantificação de Citoqueratina 10	94
5.2.5	Análise Biomecânica	96
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS.....	107
	ANEXO A	121
	ANEXO B	123

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais funções da pele é proteger o organismo contra infecções, agentes nocivos ao organismo (1), trauma mecânico e também contra a desidratação do organismo (2). Assim, qualquer atraso ou demora na sua cicatrização/ reparação, após uma injúria, pode acarretar em diversas complicações uma vez que a ferida pode ser uma porta de entrada para diversos tipos de microrganismos. É por isso que o debilitante processo de reparo tecidual, na condição de algumas doenças sistêmicas, como o caso do *Diabetes Mellitus* (DM), tem sido um grande desafio na medicina.

O *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica crônica resultante da resistência à insulina, ou a não produção desse hormônio, gerando um quadro de hiperglicemia no paciente diabético, o que poderá provocar complicações como: glicação de proteínas, doenças cardiovasculares, retinopatia, nefropatia, angiopatia e neuropatia (3). Com relação ao reparo tecidual, o aumento de citocinas e fatores pró-inflamatórios podem ser os responsáveis pela cronicidade da injúria tecidual (4, 5). Além disso, a hipóxia, falta de suprimento de oxigênio, em nível celular, pode também ser considerado um dos fatores correlacionados com o atraso no processo de reparo tecidual. Essa, dentre outros fatores, leva a ativação do fator nuclear kappaB (*Nuclear Factor kappa beta - NF-kappa b*), um fator de transcrição que pode levar a ativação do Fator de Necrose Tumoral Alpha (*Tumor Necrosis Factor alpha – TNF-α*) (6).

A irradiação ou a terapia fotobiomoduladora com laser de baixa potência tem sido amplamente utilizada com intuito de acelerar o processo de reparo tecidual. Isso é possível devido à capacidade do tecido em absorver o laser através, por exemplo, da citocromo C oxidase (Complexo V da cadeia respiratória). A citocromo C oxidase quando excitada pela luz, aumenta a produção de ATP (Adenosine Triphosphate) (7), estimula o transporte ativo de moléculas, síntese e secreção de proteínas e divisão celular (8).

No tecido epitelial, essa luz é capaz de acelerar todo o processo de cicatrização de feridas (9), aumento da deposição de colágeno (10) e angiogênese (11), liberando fatores de crescimento (12), promovendo a modulação da inflamação e analgesia (13). Além disso, é capaz de modular o processo

inflamatório, inibindo citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, as prostaglandinas E2 (PG2), TNF- α , ciclooxigenase-2 (COX-2) e interleucina 1-beta (IL-1 β) (14-17).

Entretanto, para que esses efeitos ocorram, uma série de fatores dosimétricos (dose, modo de fornecimento de energia e tempo de irradiação) e características clínicas do paciente (Idade, etnia, estado de saúde, tipo e cor do tecido) devem ser levados em consideração para que a dose correta seja absorvida pelo tecido(18).

A compreensão dos parâmetros dosimétricos é importante para o conhecimento da "dose bifásica", na qual a densidade de energia e os tempos curtos não produzem efeitos biológicos, bem como a densidade de energia e tempo muito longos de irradiação, podem causar um efeito inibitório(19). Um exemplo desse fenômeno foi demonstrado no estudo de Demidova-Rice et al. onde densidades de energia entre a 2 e 10J/cm² foram capazes de estimular o reparo tecidual, enquanto que maiores densidades de energia, como 50J/cm², produziram um efeito inibitório(20).

Além da preocupação para com todos os parâmetros dosimétricos, outro fator que também dificulta na escolha da energia correta que deve ser entregue ao tecido é a falta de consenso na literatura em estabelecer um protocolo padrão ou a falta de informações dos parâmetros utilizados, nos trabalhos publicados(21).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia fotobiomoduladora com laser de baixa potência (PBMT, do inglês, *photobiomodulation therapy*) no reparo tecidual de excisões realizadas no dorso de animais diabéticos e não-diabéticos, sendo as variáveis de tratamento: a dose de irradiação, frequência e modo de entrega da energia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para a melhor compreensão do tema da presente tese, a revisão de literatura foi subdividida nos tópicos a seguir:

2.1 PELE

A pele é o órgão que recobre a superfície do nosso corpo, sendo constituída por uma porção mais externa, a epiderme, de origem ectodérmica; e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme, camada intermediária onde se localizam os folículos pilosos e glândulas sebáceas. Abaixo dessa última camada, se encontra a hipoderme, que embora tenha a mesma origem, não é considerada como parte integrante da pele, mas confere uma função de suporte e união com outros órgãos subjacentes(22).

A epiderme é constituída principalmente por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, onde sua espessura pode variar de acordo com sua localização no corpo humano.

Ela é formada pelas seguintes camadas:

A camada basal, constituída por células prismáticas ou cubóides de alta atividade mitótica, responsável pela constante renovação da epiderme, que repousa sobre uma nítida membrana basal que separa a epiderme da derme.

A camada espinhosa, constituída por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, com expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas e que unem às células adjacentes através de ligações desmossômicas, o que confere à epiderme forte coesão entre as células e subsequente resistência ao atrito.

A camada granulosa, constituída por células poligonais, nitidamente achatadas com grande conteúdo granuloso em seu interior, parte desse conteúdo é constituído por grânulos de querato-hialina, que vão contribuir para a formação da camada córnea, e parte por grânulos de substância fosfolipídica e glicosaminoglicanas, que serão secretados para a formação de uma camada intercelular impermeável.

A camada lúcida, constituída por uma delgada camada de células achatadas, cujos núcleos e organelas desaparecem, mas que ainda se pode ver desmossomas entre suas células,

A camada córnea, constituída por células achatadas, mortas, e cheias de substância córnea em seu interior, a chamada queratina (22).

A epiderme é formada principalmente por constituintes celulares, que podem ser classificados em queratinócios, assim chamados devido ao acúmulo de tonofilamentos de citoqueratina; e por células denominadas não queratinócitos, esse, por sua vez, é constituído principalmente por: melanócitos, responsáveis pela pigmentação melânica; células de Merkel, localizada na camada basal do epitélio e na qual se acredita serem receptores mecânicos, uma vez que frequentemente são encontradas adjacentes às terminações nervosas amielínicas; células de Langerhans, mais frequentemente localizadas na derme, porém apresentam topografia variável, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos; e por fim, pelas células sanguíneas, como linfócitos, neutrófilos e mastócitos

Os queratinócitos são constituídos por: filamentos de actina, responsáveis pela motilidade celular; por microtúbulos, que estão relacionados com o transporte intracelular de organelas; e por filamentos intermediários, que no caso dos queratinócitos, são citoqueratinas, responsáveis, dentre outras funções, por estabelecer a estrutura tridimensional da célula(23).

As citoqueratinas, presentes nas células epiteliais, são chamadas de queratinas moles(24) são classificadas em 2 grupos: as do tipo I: denominadas ácidas, que são constituídas pela citoqueratina número 9 até a de número 23; e pelas citoqueratinas do tipo II, que são as básicas, constituídas pelas citoqueratinas de número 1 ao 8(25).

A expressão das citoqueratinas na epiderme é distinta dependendo da localização e função dos queratinócios, como, as citoqueratinas 5, 14 e 15, são expressas pelos queratinócitos, que estão em proliferação, localizados na camada basal da epiderme; enquanto que as citoqueratinas 1 e 10 são expressas pelos queratinócitos que perderam sua atividade mitótica e entram em processo de diferenciação, e deixam as camadas basais para atingir as camadas mais superficiais do epitélio(26, 27).

As citoqueratinas 6, 16 e 17 são as chamadas citoqueratinas hiperproliferativas, que estão localizadas nos folículos pilosos(23), e se expressam nos queratinócitos no

epitélio injuriado que está em processo de reparo tecidual(27-29), ou em doenças proliferativas, como é o caso da psoríase ou tumores(30).

A derme é a camada intermediária, gelatinosa, rica em mucopolissacarídeos, a substância fundamental, fibroblastos, e matriz fibrilar de três tipos: colágenas, elásticas e reticulares. Sua espessura é diferente ao longo do organismo, o que pode variar entre 1 até 4 mm de espessura e é composta por 3 porções: a derme papilar, constituída por uma camada pouco espessa de fibras colágenas finas e fibras elásticas, onde também se encontram numerosos fibroblastos e substância fundamental; a derme perianexial, que tem composição semelhante a derme papilar, mas, desta vez, está disposta em torno dos anexos cutâneos; e por fim a derme reticular, que significa a maior porção da derme, onde se encontram feixes colágenos mais espessos e dispostos paralelamente à epiderme, e uma menor quantidade de fibroblastos e substância fundamental(23).

A substância fundamental é formada especialmente por mucopolissacarídeos, dos quais os mais importantes são os hialuronidatos e condroitinsulfatos. Essas substâncias são importantes na constituição do gel viscoso presente na derme que auxiliará o tecido em suas propriedades mecânicas de compressão e estiramento da pele (23).

Os fibroblastos são as células responsáveis pela produção da matriz extracelular, necessária para suportar o crescimento celular(31), composta principalmente por fibras colágenas, que irão abranger 95% do tecido conectivo da derme, e pode ser dividida em 18 diferentes tipos de fibras colágenas, e varia entre as numerações do tipo I até XVIII(32).

O colágeno do tipo I, corresponde cerca de 80-90% das fibras colágenas presentes na derme (32) e está fortemente relacionado com ganho de resistência mecânica do tecido e, conseqüentemente, aumento da tensão de ruptura do mesmo(33).

A segunda maior quantidade de colágeno é representada pelo colágeno do tipo III, com representação de aproximadamente 8-12% do colágeno dérmico. Suas fibras, quando comparadas com o colágeno do tipo I, se apresentam em menor diâmetro e estão presentes em toda derme, e se concentram em áreas de contato com outras estruturas como os vasos sanguíneos(32).

A pele é capaz de exercer diversas funções no organismo, como: o controle homeostático da temperatura orgânica, com a sudorese, através da constrição e

dilatação da rede vascular cutânea; a secreção sebácea, importante para evitar a perda de água, além de exercer propriedades antimicrobianas e conter substâncias precursoras da vitamina D (34); a proteção imunológica, que protegerá o organismo contra infecções, através de constituintes celulares específicos presentes na derme(1); e a percepção do organismo contra traumas e sua proteção mecânica contra qualquer agente externo(34).

Sendo assim, o rompimento dessa estrutura de proteção, deixa o organismo mais susceptível a infecções, o que comprometeriam a saúde do indivíduo(35, 36).

2.2 REPARO TECIDUAL

O reparo tecidual pode ser didaticamente dividido em 3 fases: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação(37).

A fase inflamatória é precedida pela hemostasia gerada no tecido injuriado, a partir da vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos próximos ao local da ferida (37), que permitirão a agregação plaquetária e de leucócitos para a formação do coágulo (38).

O coágulo gerado servirá para minimizar a perda de sangue local(39), além de atuar na liberação de diversos fatores para a amplificação da cascata de coagulação, e agir como quimioatratores de células inflamatórias(38), como é o caso dos neutrófilos, que são atraídos para a região após poucas horas da injúria, a partir de quimiocinas e agentes quimiotáticos como o *Fator de crescimento transformador beta* ($TGF-\beta$), *Interleucina 1* ($IL-1$), *Interleucina 8* ($IL-8$) *Proteína quimioatractora de monócitos 1* ($MCP-1$), e lipopolissacarídeos, oriundos de produtos bacterianos(40-44).

No local da ferida, os neutrófilos serão as células predominantes nas primeiras horas após a injúria (45) e serão responsáveis por remover material estranho, bactérias, células mortas, e danos provocados na matriz extracelular, através da fagocitose e da liberação de proteínas(46), como por exemplo, a elastase e algumas metaloproteinases, que são capazes de digerir a matriz extracelular, e a liberação de radicais livres, capazes de matar bactérias (47). Logo após, por algum motivo ainda

não esclarecido, essas células sofrem apoptose e posteriormente são fagocitadas pelos macrófagos(48, 49).

Após 48 horas, os monócitos também são atraídos para o sítio da ferida, onde se transformam em macrófagos (37, 50). Seu recrutamento é regulado através da diferença de gradientes de fatores quimiotáticos, incluindo fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias(51-54), e através dos produtos da quebra da elastina e colágeno, como o *Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF)* e o *TGF- β* (55). No local da injúria, os macrófagos continuam o processo de fagocitose, iniciado pelo neutrófilos (48, 56), e atuam na regulação de outras células e numerosos fatores de crescimento, como: *TGF- β* , *Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α)*, *Fator de crescimento epidérmico (EGF)*e*Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)*,*Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF)* e *Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)*, que por sua vez irão ativar queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais para a região da ferida (57) e promover a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular(58). Assim,se entende que a participação dessa célula inflamatória se torna imprescindível para o reparo tecidual, bem como sua ativação marcará o início da fase de proliferação.

A fase de proliferação, normalmente se inicia no terceiro dia após a injuria tecidual e perpetua por aproximadamente 2 semanas (45). Ela se caracteriza pela migração de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e formação de tecido de granulação(59).

É nessa fase que as células epiteliais da borda da ferida começam o processo de proliferação e migração com o intuito de restabelecer uma barreira protetora para evitar a perda de líquidos corpóreos e invasão microbiana. Esse processo acontece através da liberação de *EGF* e *TGF* pelas plaquetas, e por macrófagos localizados na região da ferida (56, 60, 61); pelo estímulo por citocinas inflamatórias, como é o caso da *Interleucina-1 (IL-1)* e do *TNF* e através da liberação do *Fator de crescimento dos queratinócitos- 1 (KGF-1)*, *KGF-2* e *IL-6*(62, 63), sintetizados e secretados por fibroblastos, que nessa fase também se encontram no sitio da ferida, devido a secreção de *PDGF* e *EGF* pelas plaquetas e macrófagos.

Após 1 dia da injuria do tecido, já pode ser observado, histologicamente, fase de migração das células epiteliais, que tem o intuito de restabelecer a barreira protetora feita pelos queratinócitos. Essa migração pode ser descrita na literatura de dois modelos, o modelo de deslizamento (*sliding*) e o de rolamento (*rolling*)(27).

O modelo de deslizamento (*sliding*) descreve que os queratinócitos basais são capazes de depositar novos componentes da uma membrana basale migrar lateralmente sobre essa matriz provisória, e levar junto os queratinócitos basais e suprabasais que fazem ligação desmossômica com os deslizantes(64).

Já o modelo de rolamento (*rolling*), que segundo Usui et al. reflete melhor o que acontecenoprocesso de reparo tecidual de uma ferida dérmica, os queratinócitos suprabasais expostos após a injúria sofrem alterações em seu formato celular e reduzem suas uniões desmossomais, e permite que eles rolem até a membrana basal exposta(27, 65).

Após o fechamento da lesão, os queratinócitos passam por diversas alterações morfológicas e bioquímicas que irão refletir na expressão de citoqueratinas de acordo com a sua função e seu estado de diferenciação(66). Assim, enquanto as CKs 5, 14 e 15, são expressas pelas células epiteliais residentes da camada basal, responsáveis pela proliferação e reposição dessa subpopulação de células. Já a CK10 é a principal proteína expressa pelos queratinócitos suprabasais que estão comprometidos com a diferenciação terminal(27, 67).

Também é na fase de proliferação que os fibroblastos se tornam uma das células mais populosas na região de tecido injuriado, assim como as células endoteliais, que são responsáveis por iniciar a fase de angiogênese no tecido(68), sendo conduzidas até a região de ferida através da reposta sobre a liberação do *Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)*, secretado pelos macrófagos, plaquetas, outras células endoteliais e fibroblastos (37), e por outros fatores locais como: baixo pH local e hipóxia(68).

Os fibroblastos, por sua vez, são responsáveis pela produção da matriz extracelular, a fim de restabelecer o tecido injuriado(69). Inicialmente, essa matriz se representa como uma matriz fina, capaz de permitir o trânsito de fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, mas que à medida que os fibroblastos depositam colágeno, essa matriz vai se torna mais densa e rígida.

A maturação da matriz depositada pelos fibroblastos, leva a uma contração da célula, que se transformam em fibroblastos. E essa contração resulta em apoptose celular e em uma diminuição da síntese de colágeno(70).

Sobre o tecido de granulação, ocorre a deposição de fibronectina, colágeno tipo 3 e colágeno tipo 1 (71), respectivamente, sendo o aumento da deposição do

colágeno tipo 1 fortemente relacionado com o aumento da tensão de ruptura da lesão(33).

A remodelação, última fase do processo, ocorre durante a segunda semana de reparação, em que os fibroblastos têm alteração de seu fenótipo para miofibroblastos, isso devido à deposição de grandes filamentos de actina na membrana plasmática das células e também nas ligações intercelulares e com a matriz extracelular(72).

A remodelação do colágeno depositado também acontece nessa fase, em que no processo de cicatrização ocorre uma diminuição da degradação dessas partículas, pela enzima collagenase, enquanto ocorre a contínua síntese de colágeno. Já na terceira semana do processo de reparação, a pele apresenta cerca de 20% da resistência que será alcançada, sendo que, durante esse tempo, a deposição das fibras de colágeno acontece em uma velocidade mais acelerada. Após essa etapa, a velocidade de deposição dessas fibras diminui, o que reflete numa velocidade de ganho de resistência desse tecido também mais lento. Ainda nesse contexto, Clark, em 1996, relata que após completa reparação tecidual, a resistência a tração no tecido reparado ainda será cerca de 70% da tração de um tecido não injuriado(31).

2.3 DIABETES MELLITUS

Com base nas pesquisas realizadas pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), se acredita que o número de brasileiros diagnosticados com diabetes cresceu 67,9% nos últimos 10 anos, passando de 5,3% da população em 2006 para 8,9% em 2016(73, 74).

O Diabetes Mellitus é caracterizado por um transtorno metabólico múltiplo que resulta em uma hiperglicemia crônica, distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (75), e que pode ocorrer devido a vários processos patológicos, como, a destruição autoimune das células β das ilhotas pancreáticas. Essa destruição gera uma deficiência na secreção de insulina no organismo, ou até mesmo alguma anormalidade presente neste hormônio que irá caracterizar alguma resistência da ação da mesma(76).

Uma das ações da insulina no organismo é o seu papel na homeostase de glicose, que ocorre quando a concentração de glicose plasmática está aumentada, permitindo a produção e liberação de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas, que irão realizar a captação da glicose para os tecidos, a partir da via glicolítica(77).

Além de seus efeitos primários sobre a homeostase da glicose, a insulina também é capaz de promover uma série de outros eventos celulares: a regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo lipídico, síntese de glicogênio, transcrição de genes, síntese e degradação de proteínas e síntese de DNA. Portanto, a insulina desempenha papel fundamental no armazenamento normal de combustíveis ingeridos e no crescimento e diferenciação celular(77).

É possível classificar o diabetes em dois principais tipos: o tipo 1 – anteriormente atribuído como insulino dependente – apresentado em pacientes com deficiência total da produção de insulina, provocado pela destruição das células β pancreáticas, e que por isso, dependem da reposição desse hormônio para tratamento da doença(75).

Essa destruição das células β pode se apresentar de maneira rápida, normalmente vista em crianças e adolescentes, onde geralmente a primeira forma de manifestação da doença é sua forma mais grave, a cetoacidose; ou ainda essa destruição das células pode se apresentar de maneira mais lenta, normalmente vista em adultos, o que permite uma função residual da insulina suficiente para prevenir a cetoacidose por algum tempo(76).

O diabetes do tipo 2 – anteriormente denominado como diabetes não insulino dependente – pode variar de um paciente que apresenta uma predominante resistência à insulina com relativa deficiência na secreção desse hormônio, até uma predominante deficiência na secreção com uma relativa resistência dos tecidos a ação desse hormônio. Nesse caso, sua forma mais grave de manifestação, a cetoacidose, raramente ocorre, entretanto, a doença pode passar despercebida por anos, devido ao aumento gradual da hiperglicemia, o que permite, dessa maneira, um maior risco do paciente em desenvolver complicações macrovasculares e microvasculares(76).

Os sintomas normalmente presentes na doença são: a perda de peso, poliúria, polidipsia, polifagia e visão turva, sendo sua apresentação mais grave a cetoacidose

ou a síndrome hiperosmolar (75, 76). Entretanto, muitas vezes esses sintomas não são graves ou podem estar ausentes por tempos prolongados, o que permite que o paciente apresente uma hiperglicemia em um grau elevado e suficiente para causar diversas alterações patológicas, antes mesmo de qualquer diagnóstico (75).

Em longo prazo, os efeitos do diabetes incluem o desenvolvimento progressivo das complicações como retinopatia com potencial de cegueira, nefropatia que pode levar a uma insuficiência renal, neuropatia periférica com riscos de úlceras nos pés e amputações, neuropatia autonômica, que pode causar sintomas gastrointestinais, genitourinários e cardiovasculares (75, 76), além do diabético apresentar maior risco à doenças cardiovasculares, vasculares periféricas e cerebrovasculares (75).

Além disso, múltiplos fatores associados a essa doença podem levar o paciente diabético a um atraso no processo de cicatrização de feridas, sendo um dos maiores problemas de saúde observado nesses pacientes nos Estados Unidos (78).

Um dos modelos experimentais utilizados para o estudo em diabetes é a mimetização do diabetes tipo 1 a partir da injeção intraperitoneal de estreptozotocina (do inglês *Streptozotocin*, STZ) em animais, como ratos, camundongos e macacos (79-83).

A STZ é um antibiótico capaz de promover uma destruição seletiva de células beta de ilhotas pancreáticas, o que resulta em sinais característicos do diabetes mellitus tipo 1 humano, como: deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria (84).

Furman BL descreve que 40 -70 mg de STZ por quilo de peso corpóreo, foi suficiente para que a STZ causasse, a partir do segundo dia após a indução, uma hiperglicemia grave (acima de 250 mg/dl), que dura até 120 dias, que foi o tempo experimental mais longo reproduzido neste trabalho (83).

Além disso, outro estudo conduzido por Qiu JG et al. demonstrou que além dos sinais de polidipsia, poliúria e glicosúria, vista em ratos diabéticos induzidos por STZ, esse modelo animal também apresentou, em feridas realizadas após 15 dias da indução por STZ, um processo de reparo tecidual insatisfatório. Para os animais diabéticos ocorreu uma significativa diminuição na resistência à ruptura da ferida e um baixo teor de hidroxiprolina quando comparados ao modelo não diabético (85).

2.4 REPARO TECIDUAL NO DIABETES MELLITUS

O diabetes é conhecido por apresentar um retardo no processo de cicatrização de feridas, que pode ocasionar amputação de membros, ou risco maior de infecções(86). Nos Estados Unidos, a cada 1000 pessoas com diabetes, aproximadamente 5% é hospitalizada para procedimento de amputação de membros inferiores(87).

Apesar da patogênese das lesões diabéticas ainda não estar completamente esclarecida, já se sabe que alguns fatores contributivos, tais como controle metabólico, nutrição, pressão, perfusão, infecção, imunidade, equilíbrio dinâmico da matriz extracelular, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e capacidade proliferativa celular desempenham papéis importantes na cicatrização de feridas diabéticas(88).

Um fator relacionado com o atraso no processo de reparo tecidual no paciente diabético é a alteração na presença de células inflamatórias no local da ferida, onde, no diabético, acontece um atraso no recrutamento precoce de células inflamatórias e uma maior concentração de neutrófilos e macrófagos em um estágio tardio do reparo, juntamente com um conjunto de alterações na expressão de quimiocinas e fatores de crescimento(89).

O estudo de Seifter E et al. demonstra que, após 14 dias de uma incisão tecidual em dorso de ratos, a quantidade de neutrófilos no sítio da ferida foi aproximadamente 2 vezes maior em ratos diabéticos do que em feridas não diabéticas; enquanto que a quantidade de linfócitos nas feridas diabéticas foi estatisticamente menor quando comparadas às feridas não diabéticas(90).

Além disso, a função dos macrófagos em feridas diabéticas também pode aparecer comprometida, como por exemplo, na sua função de atrair maior carga de células apoptóticas para o local da ferida(91), bem como no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1 β , IL-12, IL-18, TNF- α (92).

Apesar de Fahey et al. não notar diferenças significativas dos níveis de TNF- α em exsudato de feridas diabéticas em camundongo, os autores observaram uma diminuição significativa dos níveis de leucócitos, após 7 dias da realização das feridas(93). Entretanto, Zhao H et al. observaram que após 6 dias da excisão tecidual em dorso de camundongos ocorreu uma maior concentração nos níveis de

IL-6 e TNF- α , uma maior expressão de MMP-9, e uma menor quantidade de colágeno quando comparados ao grupo controle(94).

O aumento da concentração de TNF- α , no diabético, pode se relacionar com o aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (*Advancedglycationend-productis* – AGEs) que se ligam aos seus receptores RAGEs(95), e ativam a cascata de sinalização do fator nuclear kappa B (*Nuclear fator kappa-light-chain-enhancerofactivated B cells* – Nf-kB) (96), que por sua vez ativará a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (97).

Alguns autores associam esse aumento de TNF- α , na condição de hiperglicemia, como aumento da apoptose de fibroblastos e queratinócitos(98, 99); baixa migração de queratinócitos; e angiogenese prejudicada (75), os quais estão relacionados com o retardo no processo de reparação tecidual, observado na condição de hiperglicemia crônica.

A diminuição da concentração de fibroblastos resulta na diminuição de colágeno nas feridas diabéticas, como demonstra o estudo de I Hsu et al.(100). Ainda, na condição de hiperglicemia crônica, a baixa concentração de colágeno, resulta numa diminuição da resistência mecânica do tecido, como foi observado em alguns trabalhos(101).

Além dessas alterações supracitada no processo de reparo vistas na região da derme, também é possível encontrar alterações no processo de reparo na região da epiderme, como demonstra o estudo de Okano J et al. quemostrou em feridas em dorso de ratos, que além de uma redução significativa das células epidérmicas, as células da camada basal apresentavam-se irregularmente alinhadas e com alterações estruturais. Ainda, os autores relataram que a expressão das citoqueratinas 5, 14 e 10 apresentou-se diminuída quando comparadas com o grupo controle(102).

Com relação ao processo de angiogênese, Gu XY et al.observaram, em feridas no dorso de ratos não diabéticos, uma alta expressão do fator de crescimento vascular endotelial(do inglês, *Vascular EndothelialGrowthFactor*VEGF) após 7 dias da excisão tecidual, e uma diminuição dessa expressão após 14 dias. Por outro lado, em feridas realizadas em animais diabéticos, esse fator apresentava-se diminuído em 7 dias e aumentado em 14 dias, o que mostrou um atraso no processo de angiogênese(103).

Diante de um cenário que pode prejudicar o tempo de reparação de feridas na condição do diabetes, diversas terapias vêm sendo propostas com o intuito de acelerar o processo de reparo tecidual, sendo uma delas a Terapia fotobiomoduladora com laser de baixa potência (*Photobiomodulation Therapy*, PBMT), que tem como algumas vantagens ser uma terapia não invasiva, indolor e sem efeitos colaterais (104).

2.5 TERAPIA FOTOBIMODULADORA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (PHOTOBIMODULATION THERAPY, PBMT)

A PBMT, antigamente denominada, em inglês, *LowLevel Laser Therapy* (LLLT) é uma terapia que utiliza a luz (laser ou LEDs), não ionizante, no espectro visível e infravermelho, para se obter resultados terapêuticos benéficos, como: alívio da dor ou inflamação, imunomodulação, melhora no tempo de cicatrização de feridas e regeneração de tecidos(105).

O laser, acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, é uma luz que possui propriedades específicas devido a geração de radiação eletromagnética capaz de interagir com a matéria e gera ações específicas(106).

Os lasers são divididos na literatura em dois tipos: os lasers de alta potência e os lasers de baixa potência (104, 107). Os lasers de alta potência geralmente atuam com efeito térmico no tecido e são capazes de promover cortes, coagulação, vaporização e ablação nos tecidos biológicos, dependendo de alguns fatores, como comprimento de onda e potência(108).

Os lasers de baixa potência não são capazes de gerar um efeito térmico como os lasers de alta potência, pois estes atuam no tecido com uma densidade de potência menor, gerando, dessa maneira, efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos no tecido irradiado (109).

A PBMT com o laser de baixa potência vem sendo cada vez mais utilizada na medicina e na odontologia devido a sua ação no processo inflamatório, angiogênico, e de reparo tecidual (109). Entretanto, para a obtenção dos efeitos biológicos supracitados, é necessário que a luz interaja com o tecido correspondente de maneira adequada.

Para gerar efeitos biológicos, o laser precisa ser absorvido por moléculas no tecido alvo, conhecidas como cromóforos ou fotorreceptores, que podem ser enzimas, moléculas das membranas celulares ou qualquer outro elemento celular ou extracelular que possua afinidade por algum determinado comprimento de onda, sendo a hemoglobina, mioglobina, as porfirinas, flavinas e citocromos mitocondriais, exemplos de alguns cromóforos relatados na literatura (110, 111).

A partir da absorção do laser pelos cromóforos, basicamente acontecerão dois tipos de reações: as reações primárias, induzidas pela presença da luz; e as reações secundárias, que são as reações no tecido que ocorrem na ausência da luz(112).

Segundo a teoria de Karu, a reação da luz do laser acontece inicialmente através da interação do citocromo C oxidase com a luz vermelha e/ou infravermelho, onde essa interação conduzirá a alterações no transporte de elétrons na mitocôndria(113, 114), que por sua vez, promoverá um maior bombeamento de prótons H^+ para o espaço intermembrana da mitocôndria. Esse bombeamento de prótons gerará uma diferença de gradiente eletroquímico de H^+ e fará com que os prótons H^+ localizados no espaço intermembrana na mitocôndria retornem a matriz mitocondrial, promovendo síntese de ATP(107).

Essas alterações na cadeia respiratória também alterarão o fluxo de AMP , Ca^{2+} intracelular, permitindo a síntese de DNA e RNA, necessários para proliferação celular e síntese proteica(107).

Entretanto, a irradiação em altas doses pode promover o influxo de altos níveis de Ca^{2+} intracelular causando uma hiperatividade da bomba Ca -ATPase, que pode por sua vez, esgotar as reservas ATP da célula(104).

Assim, na célula que não possui reserva energética e que devido ao alto influxo de Ca^{2+} , se encontrar com a pressão osmótica intracelular aumentada, acontecerá um grande influxo de água na célula, podendo conduzi-la a apoptose (115). Esse é um dos motivos que os fatores dosimétricos relacionados a essa terapia são tão importantes.

Os fatores dosimétricos da PBMT estão relacionados com as características ópticas do equipamento utilizado (como por exemplo, o comprimento de onda e a potência do equipamento), com as características do próprio paciente (a idade, peso, etnia, estado de saúde e tipo do tecido alvo), e com a escolha do operador diante desses dois fatores (equipamento e paciente), que irão conduzir a uma tomada de decisão sobre qual será o tempo de irradiação, frequência, modo e quantidade de energia que deve ser entregue ao tecido(21, 107).

Como por exemplo, a quantidade de energia que deve ser entregue para um tratamento de uma criança poderá ser menor do que a quantidade de energia entregue a um adulto sobre o mesmo tratamento, uma vez que a criança apresenta um metabolismo mais rápido em relação ao adulto. Entretanto a quantidade de

tecido adiposo presente no local a ser irradiado pode mudar o protocolo com a finalidade de se obter maior penetração da luz laser(21).

Outra diferença que o operador deve se atentar para escolher o melhor protocolo é com relação ao tom de pele do paciente para que não se cause nenhum efeito térmico indesejado. Joensen J et al. observaram que as peles mais escuras apresentam maior efeito térmico sobre a irradiação no comprimento de onda do infravermelho, sendo que esse efeito foi significativamente maior sobre a energia mais alta(12 J) para 904 nm com 60mW de potência, e para todas as energias testadas(2, 6, 9 e 12 J) no comprimento de onda de 810 nm com 200mW de potência, causando até mesmo desconforto nos pacientes e necessidade de interrupção da irradiação(116).

A PBMT também poderá atuar de maneira diferente dependendo do estado de saúde do tecido, como demonstra, por exemplo o estudo de Papazoglou et al. que viu que o espalhamento e o coeficiente de absorção da luz, nos comprimentos de onda de 685, 785 e 830 nm, nas feridas realizadas em animais diabéticos, durante o processo de reparo tecidual, foi maior quando comparado com o grupo não diabético(117). Ainda nesse mesmo estudo, os autores relatam uma maior absorção da luz, no comprimento de onda do vermelho (685 nm), pela hemoglobina desoxigenada do que pela hemoglobina oxigenada, o que explica o maior valor de absorção para os ratos diabéticos, que apresentam uma maior concentração de hemoglobina desoxigenada, possivelmente devido à baixa liberação de oxigênio para o tecido diabético(117).

2.6 PBMT COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL.

A PBMT tem sido amplamente utilizada, na medicina e na odontologia, com o intuito de acelerar o processo de reparo tecidual devido ao seu potencial de redução de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (118), $\text{IL-1}\beta$, IL-8 (119) e COX-2 (120); e ao seu potencial de aumento da vascularização, proliferação celular e de fibroblastos(118, 121, 122), gerando, conseqüentemente, uma maior formação de

colágeno(122-124)uma maior contração da ferida(118); e uma maior resistência à tração(125).

Por ser uma terapia que acelera o reparo tecidual e diminui a dor, diversos estudos mostram o benefício do uso da PBMT em pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço e à quimioterapia em altas doses e apresentam mucosite oral. Além disso, a PBMT é também reportada em estudos que visam a prevenção dessas lesões orais(126-129), sendo inclusive, recomendado o seu uso, pela *Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, em pacientes submetidos ao condicionamento com quimioterapia em altas doses, para o transplante de células-tronco hematopoiética(130).

Com relação aos pacientes oncológicos e aspectos dosimétricos da PBMT, Simões A et al. observaram que a frequência de aplicação do laser, assim como a combinação do laser de baixa potência, no comprimento de onda do vermelho, e o laser de alta potência infravermelho desfocado, são fatores que influenciam na resposta do paciente, com relação à analgesia e também influenciam na evolução do grau de mucosite oral. Nesse estudo, os pacientes que receberam a PBMT (660 nm, 40 mW e 0,24 J/ ponto) 3 vezes na semana apresentaram um processo de reparo tecidual mais rápido, apesar da combinação das duas terapias (baixa e alta potência desfocado) apresentar uma maior tendência à analgesia(129).

Ainda com relação ao processo de reparo tecidual, Cotomacio CC et al. observaram, em lesões de mucosite oral induzidas em hamster, através do uso de 5-fluorouracil (5-FU); que embora todos os grupos que receberam a laserterapia tenham sido melhores que o grupo sem tratamento; dentre os grupos lasers, os animais que receberam a energia total mais baixa, de 0,24J, apresentaram os melhores resultados. Além disso, os autores também observaram que o modo de entrega da energia influenciou na reparação do tecido, onde os animais que não receberam um ponto de irradiação na área central da lesão, apresentaram os piores resultados(131).

Além da PBMT apresentar resultados favoráveis ao processo de reparo tecidual em mucosas, essa terapia também é capaz promover um reparo tecidual mais rápido em pele, através da irradiação com a luz vermelha e infra-vermelha próxima(20, 124, 125).

O estudo de Sperandio FF et al., utilizou o laser de Diodo no comprimento de onda do vermelho, potência de 100 mW e energia de 3,3 J, e demonstrou que a

PBMT também foi capaz de aumentar de maneira significativa a expressão um indicador confiável de proliferação e diferenciação de células epiteliais, a proteína p63, sendo que o aumento dessa proteína pode estar relacionada com uma maturação epitelial mais rápida também vista nos animais que receberam PBMT, mostrada tanto pela redução da expressão de CK14 nas camadas superficiais epiteliais, bem como uma expressão aumentada de CK10 nas camadas superficiais do epitélio reparado (36).

Gupta A et al. também observaram uma aceleração significativa da reepitelização e da proliferação celular, revelada pela maior expressão da citoqueratina-14. Entretanto, nesse estudo os autores irradiaram o tecido por 7 dias consecutivos e compararam diferentes comprimentos de onda (635, 730 e 980 nm), utilizando potência e energia total padronizadas (22,5 mW e 9 J, respectivamente), onde nesse estudo, o comprimento de onda de 810 nm apresentou os melhores resultados em comparação com o grupo não irradiado e em comparação aos grupos irradiados com outros comprimentos de onda(132).

Entretanto o estudo de Solmaz et al., com 25 mW de potência, diferentes energias de irradiação (0,5 J e 1,5 J) e comparando o efeito de uma única irradiação com a luz vermelha e infravermelha, observou que as duas energias utilizadas no comprimento de onda do vermelho apresentou os melhores resultados com relação a reepitelização dessas ferida, e formação de colágeno. Entretanto, apenas o grupo irradiado com 0,5 J de energia no comprimento de onda do vermelho, apresentou um aumento significativo na força de rupturas dessas lesões após 5 dias da excisão tecidual, e apenas o grupo irradiado com 1,5 J de energia no comprimento de onda do vermelho, apresentou um aumento significativo na força de rupturas dessas lesões após 7 da excisão tecidual(124).

Assim como no estudo supracitado, o trabalho conduzido por Yasukawa et al., também demonstrou diferentes resultados da PBMT de acordo com os parâmetros dosimétricos utilizados. Nesse estudo os autores utilizaram o comprimento de onda do vermelho, variando a frequência de irradiação, potência e energia utilizada, e viram que para os animais que receberam a irradiação apenas no 5º dia do experimento com potência de 8,5mW e com energia de 0,12 J, apresentaram uma melhora na presença de infiltrado inflamatório, além de uma maior deposição de fibras colágenas. Entretanto, para os animais que receberam a PBMT, em dias alternados do experimento e com uma potência e densidade maiores, de 17mW e

0,25 J, respectivamente, não apresentaram a presença de infiltrado inflamatório, e mostraram uma maior deposição de fibras colágenas, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo que não recebeu irradiação(133).

Ainda nesse estudo, a irradiação com laser He-Ne, 17mW, realizada por seis dias consecutivos, aumentou a força de ruptura das feridas cirúrgicas para 13,01 N, sendo que o grupo controle apresentou uma força de ruptura de 5,01 N. O grupo que recebeu irradiação com 8,5mW de potência, também apresentou um aumento da força de ruptura quando comparado com o grupo controle, porém sem diferenças estatística(133).

Uma outra ação vista na PBMT é o seu papel na regulação do processo inflamatório (134). Shibata Y et al. mostraram que a PBMT, com a irradiação com luz infravermelha polarizada linear, suprimiu a expressão IL-1-beta induzida pela expressão de mRNA de IL-8 e, conseqüentemente, reduziu a síntese e liberação de IL-8 em células semelhantes a fibroblastos reumatoides. Da mesma forma, a irradiação também suprimiu a IL-1 induzida pela expressão de RANTES(119).

Com relação a biomodulação da resposta inflamatória em feridas em pele, ainda podemos destacar o estudo conduzido por de Medeiros ML et al., que apresentou uma melhor atividade anti-inflamatória e angiogênica induzida pela PBMT. Nesse estudo, foi utilizado o laser de comprimento de onda no vermelho, a uma potência de 40 mW, densidade de energia de 4 J/cm², e frequência de irradiação a cada 48h após a injúria, e foi visto que após 14 dias da excisão tecidual, o grupo tratado apresentou menor área de ferida remanescente, bem como menor quantidades de neutrófilos e linfócitos no local da ferida(135).

2.7 PBMT COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL NO DIABETES.

Um dos fatores que levam a um atraso no processo de reparo tecidual no diabetes é o estresse oxidativo aumentado, e a resposta inflamatória induzida por lesão epidérmica, que provoca a migração e acumulação de neutrófilos e macrófagos, que por sua vez, também produzem ROS, aumentando ainda mais o

estresse oxidativo, que causarão danos ao DNA, e consequentemente causando retardo no processo de reparo tecidual(136).

Entretanto com a utilização da PBMTé possível acelerar o processo de reparo tecidual na condição de hiperglicemia crônica através da diminuição do estresse oxidativo, como demonstrado no estudo de Tatmatsu-Rocha JCet al.. Nesse estudo, através da irradiação por 5 dias consecutivos,utilizando do comprimento de onda de 904 nm, 39,9 mW de potência, e 2,39J de energia total, os autores observaram que a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – do inglês, thiobarbituricacidreactivesubstances), utilizada para medir a perioxidação lipídica, foi estatisticamente menor em feridas cutâneas de camundongos diabéticos tratados com a PBMT quando comparados com os animais diabéticos não tratados. Ainda, os autores também observaram uma redução significativa na concentração de nitrito, tanto para os animais diabéticos e não diabéticos que receberam a irradiação; e uma maior organização das fibras colágenas para esses dois grupos irradiados (137).

A utilização do comprimento de onda do vermelho também pareceu ser capaz de acelerar o processo de reparo tecidual no modelo diabético, como foi observado pelo estudo de Santana et al., que analisou não só o efeito da PBMT nessas feridas, como também a influenciada frequência da irradiação no processo de reparo tecidual. Para isso, os autores compararam a resposta inflamatórias de feridas não tratadas com feridas tratadas com uma única irradiação de 3,12J de energia e com feridas tratadas com 4 irradiações de 0,78J cada uma, e viram que a PBMT foi capaz de desencadear a quimiotaxia leucocitária (especialmente de neutrófilos) a partir das duas horas após a lesão, independentemente da frequência de irradiação. Entretanto, 3 e 10 dias após a injúria, o grupo que recebeu menor dose apresentou melhor resposta inflamatória frente aos demais grupos. Além disso, os autores também evidenciaram um maior reparo tecidual nos momentos iniciais da lesão, em que para os grupos tratados após 3 dias a porcentagem de ferida era de aproximadamente 70%, enquanto que para o grupo controle a porcentagem de ferida era de aproximadamente 100%(138).

O retardo no processo de reparo tecidual visto no diabetes também pode ser atribuído a um atraso do recrutamento de células inflamatórias(89), sendo a alteração dos níveis de interleucina – 6 (IL-6) um dos fatores associados com a fase inflamatória tardia vista nessas feridas diabéticas(93).

Hourelid N e Abrahamse Hestudaram em fibroblastos de feridas diabéticas duas densidades de energias diferentes (5 J/cm^2 durante 37 minutos ou 16 J/cm^2 durante 2 horas; utilizando o comprimento de onda do vermelho e potência de 23 mW), e viram que a resposta da PBMT foi diferente dependendo da densidade de energia utilizada, onde para a irradiação de 5 J/cm^2 , a PBMT foi capaz de estimular a expressão de IL-6 (interleucina-6), a proliferação celular e migração de fibroblastos de feridas diabéticas, enquanto que a densidade de energia mais alta apresentou sinais de dano celular, apresentando efeito inibitório(139).

O efeito da PBMT na regulação da inflamação em feridas diabéticas também foi visto por Carvalho P de T et al. que demonstraram que a PBMT além de reduzir a quantidade de macrófagos no local da feridas, ela também foi capaz de aumentar a porcentagem de fibras de colágeno para as feridas irradiadas a partir do 3º dia após a injúria tecidual. Nesse estudo, os autores utilizaram o laser no comprimento de onda do vermelho, com 100 mW de potência e densidade de energia de 10 J/cm^2 , e tempo de irradiação de 24 segundos(140).

O estudo de Reddy et al., também evidenciou uma maior formação de colágeno em feridas de ratos diabéticos irradiados com o laser vermelho, e correlacionou esse achado com uma maior força de ruptura também a apresentadas nas feridas cirúrgicas em dorso de ratos diabéticos que receberam PBMT. Entretanto, diferente do estudo anterior, Reddy et al. utilizaram uma densidade de energia de 1 J/cm^2 , por 5 dias consecutivos, durante 3 semanas(10).

Apesar da grande maioria dos trabalhos apresentarem resultados favoráveis para o processo de reparo tecidual utilizando o laser no comprimento de onda do vermelho (141), o comprimento de onda na faixa do infra-vermelho próximo também foi capaz de favorecer a reparação de feridas diabéticas. Dancáková et al., que utilizaram o laser por 7 dias consecutivos no comprimento de onda infra-vermelho, com potência de 30mW, e tempo de irradiação de 30 segundos; observaram que o tratamento em feridas no dorso de animais diabéticos foi capaz de melhorar o processo de reparo desses animais, através melhor formação do tecido de granulação, maior número de fibroblastos, e consequente maior formação de colágeno e maior força de ruptura da ferida nos animais diabéticos irradiados quando comparados aos animais diabéticos sem irradiação(142).

Assim, podemos observar que a literatura mostra muitos estudos favoráveis sobre o uso da PBMT para o reparo tecidual, tanto em feridas normais, ratos sem

nenhum comprometimento sistêmico, quanto em feridas de animais diabéticos. No entanto, os trabalhos supracitados refletem uma realidade presente na literatura, que é a grande variabilidade nos parâmetros dosimétricos da PBMT, o que dificulta a avaliação e compreensão do que seria o melhor protocolo de irradiação que poderia ser utilizado para acelerar a reparação de feridas cutâneas.

E é por isso, que ainda se faz necessário mais estudos que elucidem o mecanismo de ação da PBMT, bem como que levem em consideração os parâmetros dosimétricos, com a finalidade de se estabelecer o melhor protocolo de irradiação para que haja estimulação do processo de reparação tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito de diferentes protocolos de irradiação com laser em baixa intensidade no reparo tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos, induzidos por estreptozotocina. Os diferentes protocolos terão como variáveis a dose, frequência de irradiação e modo de entrega da energia.

Objetivos específicos desse trabalho foram:

- Avaliação macroscópica do reparo tecidual através das análises das áreas das excisões teciduais mensuradas a partir de fotografias padronizadas;
- Avaliação histológica do processo de reparação tecidual por microscopia de luz, através da colocação com Hematoxilina e Eosina (HE), e através da coloração com Tricrômico de Mallory para quantificação de colágeno presente no tecido em processo de reparação;
- Avaliação por imunohistoquímica do processo de reparação tecidual através de anticorpo específico para a citoqueratina 10;
- Avaliação biomecânica do tecido reparado, que recebeu ou não a fototerapia, através da determinação da força de ruptura suportada pelo tecido até o momento do início do rasgamento;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a melhor compreensão da metodologia executada, a sessão foi subdividida nos tópicos a seguir:

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), com registro denº 86 na fl. 131 do livro 02 (Anexo A), e foi renovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEUA -FOUSP), sob o número de protocolo nº 12/2016 (Anexo B).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 282 ratos da raça Wistar, com 3 meses de idade, pesando cerca de 250 – 350 gramas, os quais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento.

Inicialmente, os animais foram divididos em 2 grandes grupos: diabéticos e não diabéticos. Para a indução do diabetes, foi injetado, intraperitonealmente, uma dose de 60mg/kg de Estreptozotocina (STZ, do inglês *Streptozotocin*), diluída em tampão Citrato de Sódio 0,1M, pH4. Após 72h da injeção de STZ, os animais permaneceram em jejum por 12 horas, e com auxílio de um glicosímetro (Accu-ChekPerforma®) a glicemia desses animais foi aferida a partir do sangue da veia caudal, para confirmar o quadro de diabetes. Os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250mg/dL de sangue foram considerados para o grupo dos

animais diabéticos. No grupo não-diabético, foi injetado, da mesma maneira, apenas o veículo, na mesma dose.

Após 15 dias da divisão dos animais em diabéticos e não diabéticos, os mesmos foram subdivididos de acordo com a dose, frequência e modo de entrega da energia, na ferida realizada no dorso dos animais. Além disso, os animais foram sacrificados em diferentes tempos experimentais (7, 10 e 14 dias após a realização da ferida), e as amostras das lesões de pele foram coletadas para as análises histológicas (Figura 4.1 e 4.2).

Após a realização das análises citadas acima, os grupos que obtiveram os melhores resultados, sendo dos dias 10 e 14 de sacrifício, foram selecionados para a realização da análise biomecânica (Figura 4.2).

Figura 4.1 - Fluxograma com todas as etapas experimentais

Figura 4.2-Organograma referente às análises histológicas (para coloração com hematoxilina e Eosina, coloração com o Tricrômico de Mallory e para Imunohistoquímica), mostrando a distribuição dos animais nos diferentes grupos

Fonte: o autor.

Figura 4.3-Organograma referente à análise biomecânica mostrando a distribuição dos grupos de animais

Fonte: o autor.

4.3 FERIDA CIRÚRGICA

Todos os animais foram anestesiados, no dia 1º do experimento, com Ketalar/Rompun (4ml/Kg intraperitoneal) e tricotomizados na região do dorso. A ferida cirúrgica foi realizada com um *punch* de 6 mm no dorso no animal de maneira que somente a epiderme e a derme fossem removidas, sem provocar danos no tecido muscular(36).

Para que todas as excisões fossem feitas aproximadamente no mesmo local, foi utilizado um molde pré-determinado com as medidas entre a região torácica do animal e a região lombar. Além disso, outro molde fixado ao *punch* foi utilizado, a fim de criar uma marca no tecido com nanquim que guiará a localização exata da ferida tecidual deixada pelo *punch* ao longo do processo de reparação e de experimento (Figura 4.3)

Figura 4.4—(a) Fotografia após a tricotomia do dorso com o posicionamento do molde para determinar o local que será realizado a excisão com *punch*. (b) Fotografia após a excisão tecidual com *punch* e com as marcações em nanquim. (c) Fotografia do posicionamento da ferida após 10 dias da excisão tecidual, mostrando a relação da mesma com as marcações em nanquim. (d) Fotografia da ferida após 10 dias da excisão tecidual, mostrando sua relação com as marcas em nanquim e o molde, padronizando o local da ferida

Fonte: o autor.

4.4 TERAPIA FOTOBIMODULADORA (DO INGLÊS, *PHOTOBIMODULATION THERAPY, PBMT*)

Após a excisão, os animais foram divididos de maneira aleatória e de acordo com o protocolo de irradiação, como se segue (Tabela 4.1 e Figura 4.4):

Grupo Controle: grupos de animais, diabéticos (D) e não diabéticos (C), no qual foi realizada a tricotomia e foi feita a excisão tecidual com o *punch*, porém não receberam irradiação.

Grupo L1 e L1D: grupo de animais, diabéticos (L1D) e não diabéticos (L1), em que foi realizada a excisão com o *punch* e logo após receberam um ponto central de irradiação a uma dose de 10 J/cm².

Grupo L2 e L2D: grupo de animais, diabéticos (L2D) e não diabéticos (L2), em que foi realizada a excisão com o *punch* e logo após receberam um ponto central e 4 pontos laterais de irradiação a uma dose de 10 J/cm².

Grupo L3 e L3D: grupo de animais, diabéticos (L3D) e não diabéticos (L3), em que foi realizada a excisão com o *punch* e logo após receberam um ponto central de irradiação a uma dose de 50 J/cm².

Grupo L4 e L4D: grupo de animais, diabéticos (L4D) e não diabéticos (L4), em que foi realizada a excisão com o *punch* e que receberam um ponto central de irradiação com uma dose de 10 J/cm² logo após a excisão tecidual, e também nos dias: 24h, 48h, 72h e 7 dias após a realização da ferida cirúrgica.

Grupo L5 e L5D: grupo de animais, diabéticos (L5D) e não diabéticos (L5), em que foi realizada a excisão com o *punch* e estes receberam um ponto central e 4 pontos laterais de irradiação com uma dose de 10 J/cm² logo após a excisão tecidual, e também nos dias: 24h, 48h, 72h e 7 dias após a realização da ferida cirúrgica.

Grupo L6 e L6D: grupo de animais, diabéticos (L6D) e não diabéticos (L6), em que foi realizada a excisão com o *punch* e estes receberam um ponto central de irradiação com uma dose de 50 J/cm² logo após a excisão tecidual, e também nos dias: 24h, 48h, 72h e 7 dias após a realização da ferida cirúrgica.

Figura 4.5 –Representaçãodo modo de irradiação (distribuição dos pontos de irradiação) para os grupos em (a) L1, L1D, L4 e L4D, (b) L2, L2D, L5 e L5D; e em (c) L3, L3D,L6 e L6D

Fonte: o autor.

O laser (PhotonLase III, DMC®) foi utilizado no comprimento de onda do vermelho a 660 nm, em uma potência fixada em 40 mW, a área do spot do laser é determinada em $0,028 \text{ cm}^2$ e o tempo de irradiação foi de 7 segundos para a densidade de energia de 10 J/cm^2 e de 35 segundos para a densidade de energia de 50 J/cm^2 .

Tabela 4.1 –Parâmetros de irradiação usados nos diferentes grupos

	Grupos	Potência (mW)	Densidade de energia (J/cm ²) por ponto	Tempo de irradiação (s) por ponto	Energia (J) por ponto	Quantidade de pontos	Frequência de irradiação
Nãodiabéticos	C	--	--	--	--	--	--
	L1	40	10	7	0,28	1	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L2	40	10	7	0,28	5	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L3	40	50	35	1,4	1	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L4	40	10	7	0,28	1	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual
	L5	40	10	7	0,28	5	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual
	L6	40	50	35	1,4	1	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual
Diabéticos	D	--	--	--	--	--	--
	L1D	40	10	7	0,28	1	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L2D	40	10	7	0,28	5	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L3D	40	50	35	1,4	1	Imediatamenteapós a excisãotecidual
	L4D	40	10	7	0,28	1	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual
	L5D	40	10	7	0,28	5	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual
	L6D	40	50	35	1,4	1	Imediatamenteapós, 24h, 48h, 72h e 7 diasapós a excisãotecidual

Fonte: o autor.

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a obtenção das amostras, após 7, 10 ou 14 dias da excisão tecidual, os animais foram anestesiados com Ketalar/Rompun (4ml/Kg intraperitoneal) e eutanasiados através do deslocamento cervical.

As amostras foram removidas com a utilização do mesmo molde usado no dia da excisão tecidual para que as medidas das amostras fossem padronizadas (Figura 4.4).

Para as análises histológicas, após o sacrifício dos animais, a área da ferida foi dividida exatamente ao meio, para abranger o maior diâmetro da ferida, e ambas as partes foram fixadas em fixador contendo 2% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído diluídos em tampão fosfato a 0,1M e pH 7,3-7,4, por 12 – 24h, a 4°C.

Para a análise biomecânica, após o sacrifício do animal, a área da ferida foi removida e imediatamente conduzida e analisada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral.

Toda a parte experimental com os animais foi realizada no Laboratório de Biologia Oral da FOU SP, onde as amostras para histologia foram devidamente processadas, coradas e analisadas.

4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA LESÃO

A avaliação macroscópica do processo de reparação tecidual foi realizada através de fotografias da excisão tecidual do dorso do animal. Essas foram realizadas no dia da excisão tecidual, e após 7, 10 e 14 dias da excisão tecidual. Para isso, foi utilizado uma mesa fotográfica que mantinha uma distância focal de 45cm do dorso do animal.

Todas as fotografias foram realizadas com um auxílio de uma régua milimetrada ao lado da excisão tecidual, que serviu para futura definição da escala da imagem.

As imagens foram conduzidas ao programa ImageJ, onde o tamanho da ferida, no dia da excisão e no dia do sacrifício, pode ser mensurada através da ferramenta “freehandselection”.

Posteriormente, a porcentagem de reparo da ferida foi calculada como segue (Figura 4.6) (143).

$$\% \text{ Reparo} = \frac{(\text{Área Dia1} - \text{Área DiaX}) \times 100}{\text{Área Dia1}} \quad (1)$$

Figura 4.6– (A) Captura da imagem extraída do programa Image J®, mostrando a delimitação da área inicial da excisão. (B) Figura extraída do programa Image J®, mostrando a delimitação da área final da excisão

Fonte: o autor.

4.7 ANÁLISES HISTO-MORFOLÓGICAS

Após fixadas as amostras, para as análises histológicas do processo de reparação tecidual, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1M e pH7,3-7,4, e posteriormente desidratadas e incluídas em parafina. Os blocos foram aprofundados em 180 µm, e os cortes realizados com 4 µm de espessura, sendo então, corados com HE e montadas em lamínulas com Entellan (Merck), para que depois fossem realizadas fotografias através pelo microscópio óptico Olympus BX-60.

Para a avaliação do infiltrado inflamatório, a análise foi realizada de maneira semi-quantitativa, através de uma escala que variava de 0 até 3, sendo: 0 = ausência de infiltrado inflamatório na área central da excisão tecidual, 1 = presença leve de infiltrado inflamatório na área central da excisão tecidual, 2 = presença

moderada de infiltrado inflamatório na área central da excisão tecidual e, por fim, 3 = presença intensa de infiltrado inflamatório na área central da excisão tecidual(144).

A avaliação do grau de reepitelização, foi analisada através da distância da língua epitelial com o auxílio do programa ImageJ® (Figura 4.7), para posterior cálculo, usando a seguinte fórmula (145).

$$\% \text{Reepitelização} = \frac{\text{Soma das distância da língua epitelial}}{\text{Diâmetro da ferida}} \times 100 \quad (2)$$

Figura 4.7– Fotomicrografia demonstrando o diâmetro da ferida (verde) e a distância da ferida que está recoberta por epitélio (azul)

Fonte: o autor.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Para a quantificação de colágeno as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C e em xilol, e posteriormente foram hidratadas, coradas com Tricrômico de Mallory (TM), e montadas em lâminulas com Entellan (Merck).

Os cortes foram analisados através de fotografias realizadas pelo microscópio óptico Olympus BX-60, e posteriormente essas fotográficas foram conduzidas ao programa ImageJ®.

A escala produzida pelo microscópio foi utilizada para a definição da escala da imagem no programa e posteriormente através da ferramenta “freehandselections” a quantidade de colágeno foi mensurada através da soma das áreas corada em azul, que representam o colágeno por essa coloração, sobre a área total do epitélio presente na fotomicrografia, em um aumento de 40x(Figura 4.8).

Figura 4.8– (A) Demonstração da marcação da área total do epitélio, (B) área do lado esquerdo do tecido corada em azul, (C) área do lado direito do tecido corada em azul

Fonte: o autor.

4.9 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOQUERATINA 10

Para as análises da expressão da citoqueratina 10, por imunohistoquímica os blocos também foram aprofundados a 180 μ m e os cortes foram realizados com 3 μ m de espessura. Posteriormente, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C e em xilol, e posteriormente sofreram o processo de hidratação por concentrações

decrecentes de álcool. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro suíno por 1 hora à temperatura ambiente e após incubadas com anticorpo primário (CK10, Dako Corp., Califórnia, EUA), diluídas a 1: 200 em PBS, por 13 horas a 4 °C. Em seguida, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina-biotina (Dako LSAB System-HPR) por 30 min, lavados com PBSP e submetidos a imunomarcacão com DAB (Dako) por 30min e corados com hematoxilina.

Depois de incubados os cortes foram analisados através de fotografias realizadas pelo microscópio óptico Olympus BX-60, onde a escala produzida pelo microscópio foi utilizada para a definição da escala da imagem no programa ImageJ®. Posteriormente, porcentagem de expressão da citoqueratina 10 foi mensurada através do programa ImageJ® pelo método de deconvolução de cor, que consistiu nos seguintes passos:

1. Determinar apenas a área de interesse para a análise deixando o fundo preenchido pela cor branca através das ferramentas: *"Edit/Clear outside"*.
2. Seleção e mensuração da área do epitélio através da ferramenta *"Freehand selections"*.
3. Deconvolução de cor através das ferramentas: *"Plugins/Colourfunctions/Colourdeconvolution"*.
4. Seleção da ferramenta "H DAB" e manutenção da imagem em marrom.
5. Transformação da imagem em preto e branco através da ferramenta *"Image/Type/8-bits"*
6. Seleção da área imunomarcada através da ferramenta *"Image/Adjust/Threshold"*.
7. Quantificação a área marcada (*"Total area"*) através da ferramenta *"Analyze/AnalyzeParticles"* (Figura 4.9).
8. No Excel, calcular a porcentagem total (área da seleção /área de interesse previamente recortada)*100.

Figura 4.9 – Captura das imagens extraídas do programa ImageJ® mostrando todos os passos da análise por deconvolução de cor

Fonte: o autor.

4.10 ANÁLISE BIOMECÂNICA

Após 10 e 14 dias da excisão tecidual, os animais foram eutanasiados e as amostras foram obtidas utilizando um molde medindo, 3cmx6cm, com as indicações específicas da região torácica e região lombar do animal.

O material coletado foi imediatamente conduzido para análise, onde para isso o mesmo foi recortado em modelo de ampulheta.

Para o recorte em ampulheta, foi confeccionado um dispositivo com duas lâminas de barbear formando um diâmetro de 2 cm.

O centro desse dispositivo, contém uma haste metálica ajustável que juntamente com a haste transversal serviu para a localização do centro da lesão.

O recorte com esse dispositivo permitiu que o total do diâmetro de 6mm da ferida inicial estivesse localizada ao centro da amostra.

Então, a amostra foi presa em uma garra de ferro medindo 3cmx3,2cm para execução do teste (Figura 4.10).

O teste mecânico foi conduzido por uma máquina de tensão mecânica Kratos (Modelo IKCL3-USB), a uma velocidade de 5 mm/min, padronizada com uma pré-carga de 5 N..

Cada ensaio realizado pela máquina de tensão mecânica Kratos foi filmado com a finalidade de se obter a carga (N) necessária para a ruptura inicial do tecido.

Para essa análise foram selecionados os grupos que não receberam irradiação (diabético e não diabético) e os dois melhores grupos tratados também de ambos modelos experimentais (diabético e não diabético).

Figura 4.10 – Sequência dos passos executados para o teste biomecânico.(A) Dispositivo produzido para o recorte em ampulheta (B) Obtenção da amostra utilizando o molde para padronização das amostras, (C) posicionamento do instrumento para recorte em ampulheta do tecido, (D) tecido recordado em modelo de ampulheta, (E) tecido posicionado na garra para execução do teste de tensão, e em (F) tecido rompido pelo teste de tensão mecânica

Fonte: o autor.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas análises pelo programa MiniTab 17® e foram submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade.

Para os dados normais e homocedásticos foi realizado os testes ANOVA e Tukey, para a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental e para a comparação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais. Para os dados não normais e não homocedásticos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental e o teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais.

O nível de significância de 5% foi adotado para todas as amostras.

5 RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão apresentados em 2 sessões, que foi dividida de acordo com o modelo experimental (animais não diabéticos e animais diabéticos)

5.1 ANIMAIS NÃO DIABÉTICOS

Referente aos animais não diabéticos, os resultados serão apresentados de acordo com cada análise feita que está contida nos seguintes tópicos:

5.1.1 Análises macroscópicas da lesão

Com relação as análises macroscópicas referentes ao processo de reparação tecidual do animais não diabéticos, podemos observar que nos tempos experimentais de 7 e 10 dias, todos os grupos tratados com laser apresentam melhores resultados quando comparados com o controle, principalmente os grupos L1,L2,L3 e L5, que apresentaram, após 7 dias da excisão tecidual, em média mais de 90% de reparo, enquanto os animais controles apresentaram em média menos de 80% de reparo tecidual, sendo essa diferença entra os grupos estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Após 10 dias, enquanto os grupos tratados apresentavam 100% do reparo tecidual, ou ainda, apresentavam valores muito próximos ao completo processo de reparo tecidual,foi possível identificar alguns animais do grupo controle ainda apresentaram 90% do processo de reparo realizado.

Aos 14 dias de experimento, todos os animais, tratados ou não, apresentaram o completo fechamento da ferida. (Gráfico 5.1 e Figura 5.1).

Gráfico 5.1 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de reparo tecidual (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas) (* significam os *outliers* do grupo). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (letras maiúsculas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.1 – Fotografias dos grupos de animais não diabéticos nos tempos: iniciais e com 7, 10 e 14 dias após a excisão tecidual

Fonte: o autor.

5.1.2 Análises Histo-morfológicas

Com relação ao grau de re-epitelização pela metodologia aplicada, podemos observar que aos 7 dias após a excisão tecidual, todos os grupos que receberam tratamento apresentaram resultados melhores que o grupo controle, principalmente o grupo que recebeu maior frequência de irradiação e com energia mais distribuída (L5), que apresentou uma porcentagem de re-epitelização superior a 80%. Após 10 e 14 dias, tanto os grupos tratados como o grupo controle, apresentaram um processo de reparo tecidual mais avançado (Gráfico 5.2).

Os animais não diabéticos que receberam a PBMT também apresentaram, com 7 dias, os melhores resultados frente a presença de infiltrado inflamatório, como podemos observar na Gráfico 5.3, em que todos os grupos tratados apresentaram em média grau 2 de infiltrado inflamatório (presença moderada), com exceção aos grupos L2 e L4, que apresentam, juntamente com o grupo sem tratamento uma presença intensa de infiltrado inflamatório (grau 3) (Figura 5.2).

Após 10 dias da injúria tecidual, todos os grupos que receberam a PBMT ainda apresentaram um infiltrado inflamatório moderado (grau 2), enquanto o grupo controle permaneceu com uma média de grau 3, o que evidenciou uma presença intensa de inflamação (Gráfico 5.3 e Figura 5.3).

Já com 14 dias, todos os grupos, tratados ou não, apresentaram resultados semelhantes, com a presença leve de infiltrado inflamatório (Gráfico 5.3 e Figura 5.4)

Gráfico 5.2 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de re-epitelização (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p<0.05$)

Fonte: o autor.

Gráfico 5.3 – Mediana e valores máximos e mínimos para o escore de infiltrado inflamatório (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p<0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.2 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.3 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.4 – Fotomicrografia dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

5.1.3 Análise Histológica para quantificação de colágeno

Com relação a quantificação de colágeno no tecido, podemos observar que com 7 dias de experimento que os grupos que receberam a PBMT apresentaram os melhores resultados, em especial o grupo L6 que apresentou um aumento de aproximadamente 70% de formação de colágeno em relação ao grupo controle (Gráfico 5.3 e Figura 5.5). Após 10 dias, essa diferença entre os grupos C e L6, foi ainda maior, onde o grupo L6 apresentou, nesse tempo experimental um aumento de cerca de 130% em relação ao grupo controle, sendo esses dados estatisticamente significantes (Gráfico 5.4 e Figura 5.6).

Aos 14 dias do experimento, o grupo L6 ainda apresentou uma das maiores porcentagens de formação de colágeno (66%, aproximadamente), entretanto o grupo controle também apresentou uma maior formação de colágeno aos 14 dias, de aproximadamente 63% (Gráfico 5.4 e Figuras 5.7).

Gráfico 5.4 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de formação de colágeno (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste ANOVA, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental e letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.5 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.6 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento . Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.7 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento . Aumento de 40X

Fonte: o autor.

5.1.4 Análise Imunohistoquímica para quantificação de Citoqueratina 10

Após 7 dias da excisão tecidual, novamente os grupos tratados apresentaram as maiores porcentagens de expressão de CK10, entretanto apenas os grupos L3, L4 e L5, mostraram um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle, com destaque para o grupo L5, que apresentou o melhor resultado, frente aos demais grupos, evidenciando um aumento de 130%, na expressão dessa citoqueratina, quando comparado com o grupo sem irradiação (Gráfico 5.5 e Figura 5.8). No dia 10 do experimento, os grupos que receberam a PBMT com maior frequência de irradiação (L4, L5 e L6) apresentaram resultados significantes em relação ao grupo controle, e novamente, o grupo L5 se destaca, que apresentou uma porcentagem de expressão de CK10 de 65%, enquanto o grupo sem irradiação apresentou uma porcentagem de expressão de 43% (Gráfico 5.5 e Figura 5.9).

Após 14 dias, apesar do grupo L5 apresentar um pequeno aumento na expressão dessa citoqueratina, em relação ao grupo controle (66 e 51%, respectivamente), esse aumento se mostrou estatisticamente significativo (Gráfico 5.5 e Figuras 5.10).

Gráfico 5.5 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de expressão da citoqueratina 10 (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste ANOVA, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.8 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

Figura 5.9 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

Figura 5.10 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais não diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

5.1.5 Análise Biomecânica

Com base nos resultados obtidos previamente e com o objetivo de analisar a última fase do processo de reparo tecidual, a fase de remodelação, apenas os grupos L5, L6 e controles foram selecionados para as análises de tração, após 10 e 14 dias da excisão tecidual.

A partir dos nossos resultados, podemos observar, para os animais não diabéticos, que o grupo L5 novamente apresentou resultados favoráveis a resistência mecânica do tecido quando comparado ao grupo controle, após 10 dias da excisão tecidual, esse grupo tratado apresentou um ganho de cerca de 50% na resistência mecânica do tecido.

Após 14 dias, ainda os grupos tratados apresentaram um ganho discreto na resistência mecânica do tecido, em relação ao grupo controle, entretanto esses dados não se apresentam estatisticamente significantes para esse tempo experimental (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 – Média e desvio padrão da força de tração (N) (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais não diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

5.2 ANIMAIS DIABÉTICOS

Referente aos animais diabéticos, os resultados serão apresentados de acordo com cada análise feita que está contida nos seguintes tópicos:

5.2.1 Análises Macroscópicas da lesão

As análises macroscópicas referentes ao processo de reparação tecidual dos animais diabéticos mostraram que, após 7 dias da injúria, dentre os animais que foram tratados com a PMBT, os grupos L5D e L6D mostraram os melhores resultados, apresentando em média 90% de reparo tecidual. Esses valores foram estatisticamente significante quando comparados ao grupo de animais diabéticos que não receberam irradiação, que por sua vez, apresentou a menor porcentagem de reparo tecidual (em média de 78%) (Gráfico 5.7 e Figura 5.11).

Após 10 dias, os demais grupos tratados com a PBMT, embora não tenham apresentado diferença estatisticamente significante em relação ao grupo que não recebeu tratamento, já apresentavam a maioria de seus animais com completo reparo tecidual, enquanto que o grupo que não receberam tratamento ainda apresentou parte dos seus animais com menos de 90% de reparo tecidual (Gráfico 5.7 e Figura 5.11).

Aos 14 dias, todos os animais diabéticos, tratados ou não, apresentaram 100% de reparo tecidual. (Gráfico 5.7 e Figura 5.11).

Gráfico 5.7 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de reparo tecidual (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas) (os * significam os outliers do grupo) . Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (letras maiúsculas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.11 – Fotografias dos grupos de animais diabéticos nos tempos: iniciais e com 7, 10 e 14 dias após a excisão tecidual

Fonte: o autor.

5.2.2 Análises Histo-morfológicas

Quando observamos os grupos de animais diabéticos que receberam a PBMT, no tempo experimental de 7 dias, podemos observar que esses animais apresentaram um processo de re-epitelização mais acelerando em relação ao grupo controle, especialmente o grupo L5, que apresentou para todos os seus animais um epitélio 100% re-epitelizado. Já o grupo controle, nesse mesmo tempo experimental, apresentou uma grande variabilidade de resposta, no qual a pior porcentagem de re-epitelização encontrado nesse grupo foi de 40% (Gráfico 5.8 e Figura 5.12).

O mesmo aconteceu 10 dias após da excisão tecidual, no qual todos os grupos que receberam a PBMT apresentaram um completo processo de re-epitelização da lesão, enquanto que o grupo não irradiado ainda apresentou grande variabilidade de respostas, chegando a uma pior porcentagem de re-epitelização de 75% (Gráfico 5.8 e Figura 5.13).

Após 14 dias da excisão tecidual, todos os animais tratados ou não, apresentaram um epitélio completamente re-epitelizado. (Gráfico 5.8 e Figura 5.14).

Com relação a presença de infiltrado inflamatório dos animais diabéticos, foi possível observar diferentes níveis de infiltrado inflamatório nos diferentes grupos. Os grupos que receberam maior frequência de irradiação (L4D e L6D) mostraram

um infiltrado inflamatório moderado, grau 2, já com 7 dias de experimento, enquanto que o grupo não irradiado e os grupos L1D, L2D e L3D apresentaram um infiltrado inflamatório predominantemente intenso (grau 3). Ainda sobre o mesmo tempo experimental devemos destacar o grupo L5D, que apresentou na média de seus animais uma presença leve de infiltrado inflamatório, sendo este estatisticamente significativo em relação ao grupo que não recebeu a PBMT (Gráfico 5.9 e Figura 5.12).

Após 10 dias, nos animais diabéticos, foi possível observar dois diferentes níveis de infiltrado inflamatório nos diferentes grupos - moderado (Grupos D, L1D, L2D, L6D) e leve (L3D e L4D). O grupo L5D que permaneceu com uma presença de um processo inflamatório leve (grau1), sendo este dado estatisticamente significativo em relação ao grupo sem tratamento.

Também no tempo experimental de 10 dias, podemos observar que os animais do grupo L2D e L6D apresentaram resultados estatísticos semelhantes ao grupo não tratado, principalmente o grupo L6D, que apresentou um desvio padrão mínimo, assim como o grupo diabético sem tratamento, o que indica que 100% dos animais daquele grupo tiveram presença de um infiltrado inflamatório moderado (grau 2) (Gráfico 5.9 e Figura 5.13).

Após 14 dias, o grupo que não recebeu a PBMT ainda apresentou alguns de seus animais com presença moderada de infiltrado inflamatório, enquanto os grupos L1D, L3D, L4D e L6D apresentaram uma maior tendência a uma presença leve de infiltrado inflamatório e o grupo L5D apresentou uma maior tendência a ausência de infiltrado inflamatório (Gráfico 5.9 e Figura 5.14).

Gráfico 5.8 – Mediana e valores máximos e mínimos para a porcentagem de re-epitelização (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Gráfico 5.9 – Mediana e valores máximos e mínimos para o escore de infiltrado inflamatório (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos de mesmo tempo experimental (sem diferenças estatísticas) e teste de Friedman para avaliação da evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais (letras minúsculas) ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.12 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.13 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.14 – Fotomicrografia dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

5.2.3 Análise Histológica para quantificação de colágeno

No estudo da porcentagem de formação de colágeno de animais diabéticos, podemos observar, após 7 dias da injúria, que apesar da diferença entre os grupos não ser estatisticamente significativa, os grupos tratados apresentaram uma maior formação de colágeno, principalmente o grupo L5D que apresentou um aumento de cerca de 70%, na formação de colágeno, em relação ao grupo controle. Ainda, o grupo L1D, em relação aos grupos tratados, foi o que apresentou a menor porcentagem de formação de colágeno, valor muito semelhante ao grupo sem irradiação (39% de formação de colágeno) (Gráfico 5.10 e figura 5.15).

Após 10 dias da excisão tecidual, todos as feridastratadas apresentaram uma maior formação de colágeno em relação ao grupo não irradiado. Novamente, o grupo L5D se destaca com a maior formação de colágeno entre os demais grupos, apresentando 72% de formação de colágeno, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo que não recebeu a PBMT, o qual apresentou 42% de formação de colágeno (Gráfico 5.10 e Figura 5.16).

No dia 14 do experimento, os grupos que receberam a irradiação com pontos mais distribuídos, L2D e L5D apresentaram as maiores porcentagens de colágeno, sendo, juntamente com o grupo L1D estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado por apresentar um aumento da formação de colágeno superior a 39% (Gráfico 5.10 e Figura 5.17).

Gráfico 5.10 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de formação de colágeno (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste ANOVA, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.15 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.16 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

Figura 5.17 – Fotomicrografia da coloração com Tricrômico de Mallory dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 40X

Fonte: o autor.

5.2.4 Análise Imunohistoquímica para quantificação de Citoqueratina 10

Os resultados do grupo diabético mostraram que 7 dias após o reparo tecidual, todos os grupos apresentaram uma expressão de CK10 estatisticamente semelhantes (Gráfico 5.10 e Figura 5.18). Entretanto, após 10 e 14 dias da excisão tecidual, os grupos que receberam uma maior frequência de irradiação (L4D, L5D e L6D) apresentaram um aumento de cerca de 40% em relação ao grupo D, com 10 dias, e um aumento de cerca de 30% em relação ao grupo D, com 14 dias ($p < 0,05$) (Gráfico 5.11, Figuras 5.19 e 5.20).

Gráfico 5.11 – Média e desvio padrão da porcentagem da área de expressão da citoqueratina 10 (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste ANOVA, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0,05$)

Fonte: o autor.

Figura 5.18 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 7 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

Figura 5.19 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 10 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

Figura 5.20 – Fotomicrografia da expressão de CK10 dos animais diabéticos, após 14 dias de experimento. Aumento de 400X

Fonte: o autor.

5.5 Análise Biomecânica

Com relação as análises biomecânicas após 10 dias da excisão tecidual, tanto o grupo L5D, quanto o grupo L6D apresentaram uma maior força de tração do tecido em relação ao grupo sem irradiação, apresentando uma força de tração de 3,15; 6,3 e 5,3N, para os grupos D, L5D e L6D, respectivamente.

Após 14 dias, apenas o grupo L5D manteve diferença estatística em relação ao grupo D, apresentando um aumento de 39% na força de tração suportada pelo tecido(Gráfico 5.12).

Gráfico 5.12 – Média e desvio padrão da força de tração (N) (eixo das ordenadas) em relação aos grupos de animais diabéticos, controle e irradiados (eixo das abscissas). Teste Anova, onde letras maiúsculas representam a comparação dos grupos de mesmo tempo experimental letras minúsculas representam a evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais ($p < 0.05$)

Fonte: o autor

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a PBMT, com o laser de baixa potência, na faixa de comprimento de onda do vermelho, pode acelerar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas, realizadas no dorso de animais diabéticos e não diabéticos, sendo que os parâmetros dosimétricos utilizados influenciaram no tempo e na qualidade da reparação para ambos os grupos.

Para os animais não diabéticos, a maior frequência de aplicação, em doses menores e mais distribuídas na lesão acarretaram em um reparo clínico mais rápido, maior expressão de citoqueratina 10 e maior resistência à ruptura desse tecido.

Para os animais diabéticos, novamente a maior frequência de aplicação, em doses menores e mais distribuídas no tecido, mostrou-se ser o melhor protocolo da PBMT para o reparo tecidual. Além disso, nessa condição sistêmica, a PBMT resultou em uma diminuição do processo inflamatório, possibilitando uma maior produção e remodelação de colágeno, com consequente melhora na resistência a ruptura do tecido neo-formado. Além disso, o processo de re-epitelização e maturação do epitélio também se mostrou mais rápido nos animais que receberam a irradiação com o laser de baixa potência.

Nesse estudo, a condição de diabetes foi mimetizada a partir de uma injeção intraperitoneal de Estreptozotocina (STZ), de acordo com o estudo de Simões et al. (146). A STZ, tem a capacidade de causar a metilação do DNA das células β das ilhotas pancreáticas, provocando, consequentemente, a morte dessas células, interferindo na produção e secreção de insulina (147).

Após 15 dias da indução do diabetes os animais já apresentavam todos os sinais clínicos da doença, como: polifagia, polidipsia, poliúria, diminuição de peso corporal e aumento da glicemia. Com a condição de diabetes bem estabelecida, a excisão tecidual, no dorso de todos os animais, foi realizada de acordo com alguns trabalhos presentes na literatura (10, 148, 149). Após a excisão, os animais receberam ou não o tratamento com a PBMT.

Estudos anteriores reportam alguns efeitos benéficos da PBMT na cicatrização de feridas (20, 148, 150-156), sendo que seu mecanismo de ação pode estar

relacionado, dentre outros fatores, com o aumento do fluxo sanguíneo, devido ao aumento da microcirculação durante a terapia com laser(150, 157).

Entretanto no estudo de Rabelo et al., apesar dessa terapia não ter resultado em diferenças significativas em relação ao número de vasos sanguíneos neo-formados, irradiação com um ponto central na lesão, de 0,25 J de energia, no comprimento de onda do vermelho, foi capaz de acelerar o processo de reparo tecidual através da diminuição de células inflamatórias no tecido injuriado (148).

Esses dados, vistos no estudo de Rabelo et al. estão de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, que também evidenciou que, os grupos que receberam a PBMT apresentaram um processo de reparo tecidual e re-epitelização mais acelerado, devido à diminuição do processo inflamatório.

Apesar da patogênese das feridas diabéticas ainda não estar totalmente esclarecida, sabe-se que há alteração na presença de células e citocinas inflamatórias (89, 93, 95), diminuição da capacidade proliferativa das células basais da epiderme, o que resulta no atraso do processo de re-epitelização e consequentemente do fechamento da ferida (102), como foi observado nos animais diabéticos, do presente estudo, com 7 e 10 dias do experimento e que não receberam a PBMT.

Esse atraso no processo de reparo tecidual não foi observado para os animais que receberam a PBMT, onde o processo de re-epitelização apresentou-se mais promissor, com uma porcentagem de re-epitelização superior a 80%. Além disso, é importante ressaltar que, para essa análise, a frequência e distribuição da energia entregue na lesão influenciaram de maneira positiva a re-epitelização, sendo que os melhores resultados foram observados para os grupos L5 e L5D (apresentando cerca de 100% de re-epitelização). Com isso, uma maior frequência de irradiação e a distribuição de energia em 5 pontos de 0,28 J apresentou uma tendência maior a favor do reparo tecidual, principalmente para os animais diabéticos, que apresentaram resultados estatisticamente significantes em relação ao seu respectivo grupo sem irradiação.

A diferença de resposta na re-epitelização sendo dependente da dose da PBMT também foi evidenciada no estudo de Wagner VP et al., onde, nesse estudo, os autores irradiaram, por 14 dias consecutivos, uma biopsia de 3mm de diâmetro em dorso de língua de ratos, com o total de 2 pontos de irradiação, em duas diferentes doses/ponto - 0,16 J e 0,8 J. Nesse estudo, os autores observaram que o grupo

irradiado com 0,16 J/pontode energia apresentou completa re-epitelização já com 5 dias de experimento, enquanto que o grupo irradiado com 0,8 J/ponto de energia e o grupo sem irradiação apresentaram apenas 50% do processo de re-epitelização no mesmo tempo experimental. Demonstrando que a irradiação com doses menores também foi mais significativa para a reparação do epitélio oral (158).

Entretanto, em pele, Sperandio FF et al. demonstraram que doses mais altas, de 3,3J, também conseguiram acelerar o processo de re-epitelização em feridas realizadas com *punch* em dorso de ratos, onde o grupo laser mostrou uma completa re-epitelização com 5-7 dias após a cirurgia, enquanto que o grupo controle alcançou 100% de re-epitelização apenas aos 14 dias(159). Além disso, o mesmo protocolo também foi capaz de melhorar a imuno-expressão de proteínas relacionadas à proliferação epitelial e à maturação, como a p63, CK10, CK14. Indicando que a PBMT também foi capaz de provocar uma maturação mais rápida dos queratinócitos irradiados(36).

A imuno-expressão da CK10 também foi analisada na presente tese, no qual podemos destacar que, apesar das diferenças encontradas entre a reposta à PBMT dos animais não diabéticos e diabéticos, o melhor protocolo encontrado para ambas as condições sistêmicas, foi novamente o de maior frequência de irradiação, com 5 pontos de 0,28 J de energia (grupos L5 e L5D).

Além disso, podemos ainda destacar com relação aos resultados de imuno-expressão de CK10 que, após 7 dias da excisão tecidual, os animais não diabéticos dos grupos L3 e L4 também demonstraram resultados estatisticamente significantes, em relação ao grupo não irradiado. Entretanto, quando observamos os animais diabéticos, vimos que todos os grupos, tratados ou não com a PBMT, apresentaram uma maturação do epitélio semelhante, e uma expressão de CK10 menor em relação ao grupo não diabético, o que pode ser devido à condição sistêmica desses animais ter resultado em um atraso no processo de maturação do epitélio.

Após 10 e 14 dias do experimento, a expressão dessa citoqueratina apresentou-se ainda mais aumentada, principalmente para os grupos irradiados com maior frequência, independente da condição sistêmica. Exceto o grupo L6 que, aos 14 dias de experimento, não demonstrou diferenças significativas em relação ao grupo não irradiado, elucidando que, apesar da mesma quantidade de energia entregue ao tecido, quando comparado ao grupo L5, o modo de aplicação influenciou no processo de reparo tecidual.

Com relação ao processo inflamatório presente no processo de reparo, sabe-se que após algum trauma local, as células inflamatórias, constituídas por neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos se infiltram na lesão com o intuito de ativar todo o sistema imunológico, e de produzir fatores de crescimento e citocinas(40). Porém, foi demonstrado, em feridas de pacientes diabéticos, que não só o recrutamento inicial de células inflamatórias estava prejudicado, como também a atividade bactericida de neutrófilos e outros leucócitos pode apresentar-se deficiente (160, 161), promovendo, no diabetes uma infiltração persistente dessas células inflamatórias, causando uma resposta inflamatória prolongada, atrasando o processo de reparo nessa condição sistêmica(89).

Entretanto, sabe-se também que além de todas as ações da PBMT supracitadas (reparo clínico mais rápido, maior porcentagem de re-epitelização, e maior maturação do epitélio), outra ação importante dessa terapia é a modulação do processo inflamatório, o qual exerce papel importante no processo de reparação tecidual, principalmente em uma condição de hiperglicemia crônica(140, 162-165).

No presente trabalho, após 7 dias de injúria tecidual, o processo de reparação tecidual, nos animais não diabéticos, não se encontravamais no pico da fase inflamatória, o que nos faz acreditar que a partir desse momento, o efeito da PBMT foi mais discreto, não demonstrando diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, com os grupos tratados.

Entretanto, quando observamos os animais diabéticos, nota-se uma ação significativa na diminuição do infiltrado inflamatório, após 7 e 10 dias do experimento, principalmente para o grupo L5D. O que novamente demonstra que a condição sistêmica desses animais acarretou em uma resposta inflamatória mais exacerbada para o grupo sem irradiação e em uma melhor resposta do tecido tratado com a PBMT.

Ainda, outro aspecto importante foi a resposta, do tecido dos animais diabéticos, frente aos diversos protocolos de irradiação, o qual apenas o grupo com maior frequência de irradiação e a entrega da energia de maneira mais distribuída na lesão apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle e aos demais grupos tratados, demonstrando que o grupo mencionado acima provavelmente já se encontrava em uma fase mais avançada do processo de reparação tecidual, indicando que o mesmo recebeu a melhor combinação de fatores dosimétricos da PBMT proposta neste estudo.

Doses similares foram utilizadas por Rodrigues NC et al. para avaliar o reparo muscular de crioferidas em pernas de ratos. Nesse trabalho, os autores compararam as doses de 0,4 J e 2 J, realizadas 5 vezes por semana, durante 21 dias, com o grupo sem irradiação e, evidenciaram que, o protocolo com energia mais baixa conseguiu diminuir, de maneira significativa, a área de necrose da lesão e a expressão da COX-2, quando comparado ao grupo de 2 J e ao grupo controle(120).

Em pele, alguns artigos na literatura também reportam que a PBMT apresentou efeitos positivos na modulação do processo inflamatório e estimulação da proliferação celular (como células precursoras miogênicas e fibroblastos), podendo, dessa maneira, resultar em uma maior produção de colágeno, e consequentemente em uma cicatrização melhorada do tecido(118, 135, 166).

No presente estudo também foi observado um aumento na produção de colágeno após o tratamento com a PBMT. Após 10 dias de experimento, que se caracteriza no fim da fase proliferativa e início da fase de remodelação, observamos para os animais não diabéticos, que apesar de todos os grupos tratados com a PBMT apresentarem maiores porcentagens de formação de colágeno, apenas o grupo L6, foi estatisticamente significativo em relação ao controle. Os animais desse grupo receberam maior frequência de irradiação, com uma energia de 1,4 J, entregue no centro da lesão.

Esses resultados concordam com o estudo de Chung TY et al., no qual os autores compararam diversas energias de irradiação em feridas em dorso de camundongos e viram que, dentre o grupo controle e os grupos irradiados com 0,8 J, 1,6 J e 3,2 J, o protocolo com irradiação de 1,6 J apresentou uma melhora significativa, com relação a porcentagem de re-epitelização, a formação de tecido de granulação e formação de colágeno. Ainda, sobre esse trabalho, é válido ressaltar que os autores utilizaram o comprimento de onda do vermelho, a uma potência de 80 mW, e uma frequência de irradiação diária, por um período de 7 dias(167).

Com relação aos animais diabéticos, o grupo L5D foi o único grupo que apresentou um aumento da porcentagem de colágeno estatisticamente significativo, evidenciando mais uma vez a influência da frequência de irradiação e o modo de entrega da energia no tecido.

Com 14 dias após a excisão tecidual, a porcentagem de formação de colágeno passou a ser novamente semelhante entre os grupos de animais não diabéticos, independente do tratamento, onde essa reposta pode ser possível devido ao tempo

de 14 dias após a injúria que foi suficiente para que o grupo controle se igualasse ao tempo da fase de remodelação, na qual os grupos tratados já se encontravam.

Entretanto, quando analisamos os animais diabéticos, ainda se pode observar diferenças na porcentagem de formação do colágeno, uma vez que esse modelo experimental pode apresentar alguns fatores que levam ao atraso do processo de reparo.

Com relação às diferenças encontradas na porcentagem de colágeno para os animais diabéticos aos 14 dias do experimento, podemos destacar que, o grupo sem tratamento, apresentou a menor porcentagem de colágeno do que os demais grupos tratados, e que os grupos L1D, L2D, e L5D foram os grupos que apresentaram a maior formação de colágeno, sendo significantes em relação ao grupo D, o que pode indicar que a densidade de energia de $10\text{J}/\text{cm}^2$, e a energia de $0,28\text{ J/ponto}$, comum a estes grupos, foi benéfica e capaz de resultar na maior formação de colágeno.

Diferente do estudo de Chung TY et al., existem outros estudos na literatura que estão de acordo com os nossos resultados, onde os autores reportam a ação benéfica de baixas energias de irradiação frente à proliferação de fibroblastos e aumento da formação de colágeno. Como exemplo, o estudo de Solmaz et al. que comparou diferentes energias, $0,5\text{ J}$ e $1,5\text{ J}$, e observou que apesar de ambas aumentarem a proliferação de fibroblastos e consequentemente de aumentarem a formação de colágeno, onde o grupo irradiado com menor dose obteve os melhores resultados com relação às análises de tração do tecido(124).

O estudo de Yasukawa et al., também reportou que energias de irradiação mais baixas podem diminuir o infiltrado inflamatório, aumentar a formação de colágeno e aumentar a resistência à tração do tecido, onde nesse estudo, os autores observaram que a melhor ação da PBMT, foi vista para a energia de $0,25\text{ J}$ com uma frequência de irradiação em dias alternados(133).

As análises de tração mecânica do tecido também foram realizadas em nosso estudo com o intuito de validar os resultados encontrados sobre a porcentagem de colágeno. Entretanto, para essa análise, foram selecionados apenas os grupos C, D, que foram os grupos que apresentaram menor formação de colágeno, e os grupos L5, L5D, L6 e L6D, que foram os grupos que apresentaram os melhores resultados de formação de colágeno.

De acordo com os resultados referentes aos animais não diabéticos, com 10 dias de experimento, pode-se observar que apesar do grupo L6 ter apresentado uma

maior formação de colágeno, apenas o grupo L5 apresentou uma maior força de tração suportada pelo tecido, sendo esse dado estatisticamente significativo em relação ao controle, isso possivelmente pode ser devido as outras características do reparo tecidual o qual o grupo L5 obteve melhor resposta.

Após 14 dias da excisão tecidual, esse mesmo modelo experimental, não demonstrou diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados, corroborando com os dados encontrado sobre a porcentagem de colágeno.

Com relação aos animais diabéticos, os dados da análise de tração mecânica do tecido correlacionam-se com os dados de porcentagem de formação de colágeno, onde o grupo L5D apresentou um aumento significativo em relação ao controle nos tempos de 10 e 14 dias do experimento.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais deste estudo e nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- PBMT, independente da dose, modo de entrega da energia e frequência de irradiação pode acelerar o processo de reparo tecidual, em feridas excisionais realizadas no dorso de animais não diabético e diabéticos;

- Independente do modelo experimental (diabético e não diabético) os parâmetros dosimétricos da PBMT influenciaram na resposta tecidual, em que irradiação com uma maior frequência de irradiação, em energias menores e mais distribuídas na lesão, pareceu ser o protocolo mais promissor, por acelerar o processo de re-epitelização, diminuir o infiltrado inflamatório e aumentar a porcentagem de formação de colágeno, imunoexpressão de CK10 e resistência a tração do tecido neo-formado.

REFERÊNCIAS¹¹

1. Kidokoro R, Nakajima K, Kobayashi F, Takeda Y, Matsuzaka K, Katakura A, et al. A comparative study of the effects of 4-META/MMA-TBB resin and cyanoacrylate on wound healing of skin defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Jan;104(1):197-203.doi: 10.1002/jbm.b.33375
2. Watt FM. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci*. 2002 Apr;28(3):173-80.
3. Houreld NN. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *Scient World J*. 2014 Jan 6;2014:398412. doi: 10.1155/2014/398412.
4. Komesu MC, Tanga MB, Buttros KR, Nakao C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*. 2004 Oct;11(2):63-7.
5. Tian M, Qing C, Niu Y, Dong J, Cao X, Song F, et al. The relationship between inflammation and impaired wound healing in a diabetic rat burn model. *J Burn Care Res*. 2016 Mar-Apr;37(2):e115-24. doi: 10.1097/BCR.0000000000000171.
6. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):1013-21.
7. Karu T. Cellular mechanisms of photobiomodulation. In: De Freitas PMSimões A, editor. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA:Wiley Blackwell; 2015.
8. Roskosk R. *Biochemistry*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995.
9. do Nascimento PM, Pinheiro AL, Salgado MA, Ramalho LM. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. *Photomed Laser Surg*. 2004 Dec;22(6):513-8.
10. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2001 May-Jun;9(3):248-55.
11. Santos NR, dos Santos JN, dos Reis JA, Jr., Oliveira PC, de Sousa AP, de Carvalho CM, et al. Influence of the use of laser phototherapy (lambda660 or 790 nm) on the survival of cutaneous flaps on diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2010 Aug;28(4):483-8. doi: 10.1089/pho.2009.2500.
12. Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, et al. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2004 Aug;22(4):281-90.

¹ De acordo com estilo Vancouver

13. Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2000 Apr 3;149(1):17-22.
14. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Feb;24(1):33-7.
15. Gavish L, Asher Y, Becker Y, Kleinman Y. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg Med.* 2004;35(5):369-76.
16. Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.* 2006 Sep;38(8):779-86.
17. Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2000 Feb;108(1):29-34.
18. Chow R. Low level laser therapy - mechanism of action: analgesia. In: Freitas PMd, Simões A, editors. *Laser in dentistry - guide for a clinica practice*. USA:Wiley Blackwell; 2015.
19. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009 Sep 1;7(4):358-83. doi: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.
20. Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-Level Light Stimulates Excisional Wound Healing in Mice. *Lasers Surg Med.* 2007 Oct;39(9):706-15.
21. Tunér J, Ribeiro MS, Simões A. Dosimetry. In: Freitas PM, Simões A, editors. *Laser in dentistry - guide for a clinica practice*. USA:Wiley Blackwell; 2015.
22. Junqueira LC, Carneiro J, editor. *Histologia básica*. 7 ed Rio de Janeiro: Guanabara; 1990. Chapter 18, Pele e Anexos; p. 271-280.
23. Bolognia J, Jorizzo JL, Schaffer JV. *Dermatologia*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2015.
24. Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Beckhaus U, Rackwitz HR, et al. The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19874-84.
25. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Feb;14(1):110-22.

26. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Apr;6(4):328-40.
27. Usui ML, Underwood RA, Mansbridge JN, Muffley LA, Carter WG, Olerud JE. Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound Repair Regen.* 2005 Sep-Oct;13(5):468-79.
28. Mansbridge JN, Knapp AM. Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol.* 1987 Sep;89(3):253-63.
29. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(3):381-97.
30. Cohen PR, Ulmer R, Theriault A, Leigh IM, Duvic M. Epidermolytic acanthomas: clinical characteristics and immunohistochemical features. *Am J Dermatopathol.* 1997 Jun;19(3):232-41.
31. Clark RAF, Hensen RPM. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Springer Science Business Media; 1998.
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4^a ed. New York: Garland Science; 2002.
33. Diegelmann RF, Rothkopf LC, Cohen IK. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. *J Surg Res.* 1975 Oct;19(4):239-43.
34. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998 Jun 29;353(1370):831-7.
35. Rotty JD, Coulombe PA. A wound-induced keratin inhibits Src activity during keratinocyte migration and tissue repair. *J Cell Biol.* 2012 Apr 30;197(3):381-9. doi: 10.1083/jcb.201107078.
36. Sperandio FF, Simoes A, Correa L, Aranha AC, Giudice FS, Hamblin MR, et al. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics.* 2015 Oct;8(10):795-803. doi: 10.1002/jbio.201400064.
37. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S.
38. Szpadarska AM, Egozi EI, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):1130-7.
39. Pool JG. Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol.* 1977 Aug;43(8):776-80.

40. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001 Apr;69(4):513-21.
41. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):615-28.
42. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1849-60.
43. Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol.* 1986 Jun 15;136(12):4548-53.
44. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest.* 1985 Nov;76(5):2003-11.doi:10.1172/JCI112200.
45. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Feb;1(2):142-9. doi: 10.5966/sctm.2011-0018.
46. Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, et al. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(15):5492-505.
47. Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 1999 Nov-Dec;7(6):433-41.
48. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care.* 2004 Jan-Feb;17(1):24-35.
49. Cotran RS, Mayadas-Norton T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris).* 1998 Mar;46(3):164-70.
50. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):514-25.doi:10.1038/sj.jid.5700701.
51. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1693-8.doi:10.1172/JCI1020.

52. Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J*. 2000 Apr 1;347 Pt 1:265-73.
53. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):835-70.doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835.
54. Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol*. 2000 Aug;115(2):245-53.doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00029.x.
55. Ramasastry SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg*. 2005 Apr;32(2):195-208.doi:10.1016/j.cps.2004.12.001.
56. Hunt TK. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med*. 1988 Dec;17(12):1265-73.
57. Jimenez PA, Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res*. 1999 Feb;81(2):238-42.doi:10.1006/jsre.1998.5501.
58. DiPietro LA, Polverini PJ. Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt*. 1993 Aug;(92):238-47.
59. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42.doi:10.1177/147323000903700531.
60. Banas RA, Trumpower C, Bentejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol*. 2008 Jun;69(6):321-8. doi: 10.1016/j.humimm.2008.04.007.
61. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS, Parolini O. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):182-92.doi:10.1634/stemcells.2007-0491.
62. Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol*. 1993 Jul;122(2):417-29.
63. Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA, et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol*. 1999 Aug;188(4):431-8.doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199908)188:4<431::AID-PATH362>3.0.CO;2-B.
64. Smith KL, Dean SJ. Tissue repair of the epidermis and dermis. *J Hand Ther*. 1998 Apr-Jun;11(2):95-104.

65. Laplante AF, Germain L, Auger FA, Moulin V. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J*. 2001 Nov;15(13):2377-89.doi:10.1096/fj.01-0250com.
66. Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest*. 1994 Jun;70(6):916-24.
67. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24.
68. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):40-6.doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.
69. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:355-67.
70. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003 May;13(5):264-9.
71. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest*. 1980 Jul;43(1):47-51.
72. Welch MP, Odland GF, Clark RA. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*. 1990 Jan;110(1):133-45.
73. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância e fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico 2016. [citado 24 de nov 2017]. Disponível em:
http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf.
74. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância e fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico 2006. [citado 24 nov 2017]. Disponível em:
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/vigitel-2006-brasil.pdf>.
75. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):539-53.doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S.
76. Kerner W, Bruckel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Jul;122(7):384-6. doi: 10.1055/s-0034-1366278.
77. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995 Apr;16(2):117-42.doi:10.1210/edrv-16-2-117.
78. Xu J, Wu W, Zhang L, Dorset-Martin W, Morris MW, Mitchell ME, et al. The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment:

correction with mesenchymal stem cell treatment. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2906-12. doi: 10.2337/db12-0145.

79. Fukuoka CY, Torres Schroter G, Nicolau J, Simoes A. Low-power laser irradiation in salivary glands reduces glycemia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1246-1254. doi: 10.1002/jbio.201600175.

80. Fukuoka CY, Simoes A, Uchiyama T, Arana-Chavez VE, Abiko Y, Kuboyama N, et al. The effects of low-power laser irradiation on inflammation and apoptosis in submandibular glands of diabetes-induced rats. *PLoS One*. 2017 Jan 18;12(1):e0169443. doi:10.1371/journal.pone.0169443.

81. Ibuki FK, Simoes A, Nicolau J, Nogueira FN. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):911-8. doi: 10.1007/s10103-012-1173-5.

82. Dancáková L, Vasilenko T, Kováč I, Jakubčová K, Hollý M, Revajová V, et al. Low-level laser therapy with 810nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2014 Apr;32(4):198-204. doi: 10.1089/pho.2013.3586.

83. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Sep 1;70:5.47.1-20. doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70.

84. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev*. 1987 Jul;3(3):751-78.

85. Qiu JG, Chang TH, Steinberg JJ, Levenson SM. Single local instillation of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan prevents diabetes-induced impaired wound healing. *Wound Repair Regen*. 1998 Sep-Oct;6(5):449-56.

86. Keswani SG, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A, Alaei D, et al. Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen*. 2004 Sep-Oct;12(5):497-504. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12501.x.

87. American Diabetes Association. National diabetes statistics report 2017. [citado 24 nov 2017]. Disponível em: <http://www.diabetes.org/assets/pdfs/basics/cdc-statistics-report-2017.pdf>.

88. Lao G, Ren M, Wang X, Zhang J, Huang Y, Liu D, et al. Human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improved wound healing in diabetes through its anti-apoptotic effect. *Exp Dermatol*. 2017 Sep 8. doi: 10.1111/exd.13442.

89. Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular*. 2007 Nov-Dec;15(6):350-5. doi:10.2310/6670.2007.00056.

90. Seifter E, Rettura G, Padawer J, Stratford F, Kambosos D, Levenson SM. Impaired wound healing in streptozotocin diabetes. Prevention by supplemental vitamin A. *Ann Surg*. 1981 Jul;194(1):42-50.
91. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*. 2010 Mar 4;5(3):e9539.doi:10.1371/journal.pone.0009539.
92. Wen Y, Gu J, Li SL, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL. Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology*. 2006 May;147(5):2518-25.doi:10.1210/en.2005-0519.
93. Fahey TJ, 3rd, Sadaty A, Jones WG, 2nd, Barber A, Smoller B, Shires GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res*. 1991 Apr;50(4):308-13.
94. Zhao H, Lu S, Chai J, Zhang Y, Ma X, Chen J, et al. Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation. *J Diabetes Complications*. 2017 Sep;31(9):1363-1369. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.06.011.
95. Zong H, Ward M, Madden A, Yong PH, Limb GA, Curtis TM, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Muller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2656-66. doi: 10.1007/s00125-010-1900-z.
96. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):949-55.
97. Bierhaus A, Schiekfer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2792-808.
98. Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *Int J Exp Pathol*. 2009 Aug;90(4):412-22. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00662.x.
99. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res*. 1994 Jul;100:43-6.
100. Hsu I, Parkinson LG, Shen Y, Toro A, Brown T, Zhao H, et al. Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse model of delayed wound healing. *Cell Death Dis*. 2014 Oct 9;5:e1458.doi:10.1038/cddis.2014.423.
101. Immonen JA, Zagon IS, Lewis GS, McLaughlin PJ. Topical treatment with the opioid antagonist naltrexone accelerates the remodeling phase of full-thickness wound healing in type 1 diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Oct;238(10):1127-35. doi: 10.1177/1535370213502632.

102. Okano J, Kojima H, Katagi M, Nakagawa T, Nakae Y, Terashima T, et al. Hyperglycemia induces skin barrier dysfunctions with impairment of epidermal integrity in non-wounded skin of type 1 diabetic mice. *PLoS One*. 2016 Nov 15;11(11):e0166215. doi: 10.1371/journal.pone.0166215.
103. Gu XY, Shen SE, Huang CF, Liu YN, Chen YC, Luo L, et al. Effect of activated autologous monocytes/macrophages on wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013 Oct;102(1):53-9. doi: 10.1016/j.diabres.2013.08.004.
104. Freitas PM, Simões A. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA: Wiley Blackwell; 2015.
105. Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2017 May;170:197-207. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014.
106. Grecco C, Vollet-Filho JD, Carvalho MT, Bagnato VS. Physics lasers and LEDs: Basic concepts. In: Freitas PM, Simões A, editors. *Laser in dentistry: guide for a clinica practice*. USA: Wiley blackwell; 2015.
107. Eduardo CP. *Fundamentos de odontologia: lasers em odontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
108. Zezell DM, Ana PA. High power laser and their interaction with biologia tissues. In: Freitas PM, Simões A, editors. *Lasers in dentistry: guide for a clinical practice*. USA: Wiley Blackwell; 2015.
109. Chavantes MC, Ribeiro MS, Pinto NC. Low power lasers: Introduction. In: Freitas PM, Simões A, editors. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA: Wiley Blackwell; 2015.
110. Beckerman H, de Bie RA, Bouter LM, De Cuyper HJ, Oostendorp RA. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. *Phys Ther*. 1992 Jul;72(7):483-91.
111. Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Feb 28;12(3):305-10.
112. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: A review. *J Investig Med*. 2000 Sep;48(5):312-26.
113. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.
114. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17. doi:10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

115. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Oct;11(1):87-91.
116. Joensen J, Demmink JH, Johnson MI, Iversen VV, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. The thermal effects of therapeutic lasers with 810 and 904 nm wavelengths on human skin. *Photomed Laser Surg*. 2011 Mar;29(3):145-53. doi: 10.1089/pho.2010.2793.
117. Papazoglou ES, Weingarten MS, Zubkov L, Zhu L, Tyagi S, Pourrezaei K. Optical properties of wounds: diabetic versus healthy tissue. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2006 Jun;53(6):1047-55. doi:10.1109/TBME.2006.873541.
118. Keshri GK, Gupta A, Yadav A, Sharma SK, Singh SB. Photobiomodulation with pulsed and continuous wave near-infrared laser (810 nm, al-ga-as) augments dermal wound healing in immunosuppressed rats. *PLoS One*. 2016 Nov 18;11(11):e0166705. doi: 10.1371/journal.pone.0166705.
119. Shibata Y, Ogura N, Yamashiro K, Takashiba S, Kondoh T, Miyazawa K, et al. Anti-inflammatory effect of linear polarized infrared irradiation on interleukin-1beta-induced chemokine production in MH7A rheumatoid synovial cells. *Lasers Med Sci*. 2005 Dec;20(3-4):109-13. doi:10.1007/s10103-005-0350-1.
120. Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DC, Fernandes K, Parizotto NA, Renno AC. Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. *Braz J Phys Ther*. 2014 Sep-Oct;18(5):395-401.
121. Rezende SB, Ribeiro MS, Nunez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2007 Jun 26;87(3):145-53. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.02.005.
122. Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Citta M, Soares DG, Scheffel DS, et al. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. *Lasers Med Sci*. 2017 Mar 11. doi: 10.1007/s10103-017-2176-z.
123. Kilik R, Lakyova L, Sabo J, Kruzliak P, Lacjakova K, Vasilenko T, et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:269253. doi: 10.1155/2014/269253.
124. Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2017 May;32(4):903-910. doi: 10.1007/s10103-017-2191-0.
125. Suzuki R, Takakuda K. Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. *Lasers Med Sci*. 2016 Nov;31(8):1683-1689. doi:10.1007/s10103-016-2038-0.

126. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 1999 Jul;7(4):244-52.
127. Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: Results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997 Jul 1;38(4):697-703.
128. Abramoff MMF, Lopes NNF, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran EM, et al. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):393-400. doi: 10.1089/pho.2007.2144.
129. Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PHRN, Cristófaró M, et al. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: Comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):264-70. doi: 10.1002/lsm.20758.
130. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1453-61. doi: 10.1002/cncr.28592.
131. Cotomacio CC, Campos L, Nesadal de Souza D, Arana-Chavez VE, Simoes A. Dosimetric study of photobiomodulation therapy in 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *J Biomed Opt*. 2017 Jan 1;22(1):18003. doi: 10.1117/1.JBO.22.1.018003.
132. Gupta A, Dai T, Hamblin MR. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):257-65. doi: 10.1007/s10103-013-1319-0.
133. Yasukawa A, Hrui H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci*. 2007 Aug;69(8):799-806.
134. Bjordal JM, Lopes-Martins RB, Frigo L. Low Level laser therapy - mechanism of action: inflammatory process. In: Freitas PM, Simões A, editors. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA: Wiley Blackwell; 2015.
135. de Medeiros ML, Araujo-Filho I, da Silva EM, de Sousa Queiroz WS, Soares CD, de Carvalho MG, et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci*. 2017 Jan;32(1):35-43. doi: 10.1007/s10103-016-2080-y.
136. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997 May 15;324(Pt 1):1-18.

137. Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Damasceno Maia F, do Nascimento NR, Driusso P, et al. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Nov;164:96-102. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.017.
138. de Loura Santana C, Silva Dde F, Deana AM, Prates RA, Souza AP, Gomes MT, et al. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PLoS One*. 2015 Apr 24;10(4):e0122042. doi: 10.1371/journal.pone.0122042.
139. Houreld N, Abrahamse H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm² stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. *Diabetes Technol Ther*. 2007 Oct;9(5):451-9. doi:10.1089/dia.2007.0203.
140. Carvalho Pde T, Silva IS, Reis FA, Perreira DM, Aydos RD. Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Feb;25(1):71-9.
141. Sousa RG, Batista Kde N. Laser therapy in wound healing associated with diabetes mellitus - Review. *An Bras Dermatol*. 2016 Jul-Aug;91(4):489-93. doi: 10.1590/abd1806-4841.20163778.
142. Dancakova L, Vasilenko T, Kovac I, Jakubcova K, Holly M, Revajova V, et al. Low-level laser therapy with 810 nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Photomed Laser Surg*. 2014 Apr;32(4):198-204. doi: 10.1089/pho.2013.3586.
143. Wu X, Alberico S, Saidu E, Rahman Khan S, Zheng S, Romero R, et al. Organic light emitting diode improves diabetic cutaneous wound healing in rats. *Wound Repair Regen*. 2015 Jan-Feb;23(1):104-14. doi: 10.1111/wrr.12258.
144. Sperandio FF. Foto-dinâmica com utilização de corante azul de metileno [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2009.
145. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol*. 2001 Aug;159(2):457-63.
146. Simoes A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2009 Dec;27(6):877-83. doi: 10.1089/pho.2008.2452.
147. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol*. 1995 Dec 22;50(12):2015-20.

148. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006 Aug;24(4):474-9.
149. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):344-51.
150. Yu W, Naim JO, Lanzaforme RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 1997;20(1):56-63.
151. Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg.* 1987 Jan;18(1):47-50.
152. Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):187-90.
153. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg.* 1981 Mar;116(3):293-6.
154. Asghari M, Kanonisabet A, Safakhah M, Azimzadeh Z, Mostafavinia A, Taheri S, et al. The effect of combined photobiomodulation and metformin on open skin wound healing in a non-genetic model of type II diabetes. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Apr;169:63-69. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.03.002.
155. Lau P, Bidin N, Krishnan G, Anaybaleg SM, Sum MB, Bakhtiar H, et al. Photobiostimulation effect on diabetic wound at different power density of near infrared laser. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Oct;151:201-7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.009.
156. Sharifian Z, Bayat M, Alidoust M, Farahani RM, Rezaie F, Bayat H. Histological and gene expression analysis of the effects of pulsed low-level laser therapy on wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1227-35. doi: 10.1007/s10103-013-1500-5.
157. Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer PM, Busch M, Reiser M, et al. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B.* 2000 Jan;54(1):55-60.
158. Wagner VP, Meurer L, Martins MAT, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013 Dec;18(12):128002. doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128002.
159. Sperandio FF, Simões A, Aranha ACC, Corrêa L, De Sousa SCOM. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. *Photomed Laser Surg.* 2010 Oct;28(5):581-7. doi: 10.1089/pho.2009.2601.

160. Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch DK, Sandhu N, Reiber GE, et al. Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1999 Mar;22(3):382-7.
161. Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Wykretowicz A, Szczepanik A, Siekierka H. Phagocytosis, bactericidal capacity, and superoxide anion (O₂⁻) production by polymorphonuclear neutrophils from patients with diabetes mellitus. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*. 1985;112(5):658-68.
162. Viegas VN, Abreu ME, Viezzler C, Machado DC, Filho MS, Silva DN, et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. *Photomed Laser Surg*. 2007 Dec;25(6):467-73. doi:10.1089/pho.2007.1098.
163. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar IE. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):282-90. doi: 10.1002/lsm.20766.
164. Uzeda ESVD, Rodriguez TT, Rocha IA, Xavier FC, Dos Santos JN, Cury PR, et al. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers Med Sci*. 2016 Sep;31(7):1363-70. doi: 10.1007/s10103-016-1985-9.
165. Núñez SC, França CM, Silva DFT, Nogueira GEC, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers Med Sci*. 2013 Feb;28(2):633-41. doi: 10.1007/s10103-012-1105-4.
166. Fiorio FB, Dos Santos SA, de Melo Rambo CS, Dalbosco CG, Serra AJ, de Melo BL, et al. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci*. 2017 Nov;32(8):1769-1782. doi: 10.1007/s10103-017-2254-2.
167. Chung TY, Peplow PV, Baxter GD. Laser photobiostimulation of wound healing: defining a dose response for splinted wounds in diabetic mice. *Lasers Surg Med*. 2010 Nov;42(9):656-64. doi: 10.1002/lsm.20981.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **086** nas fls. **131** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Alyne Simões Gonçalves**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Análise do efeito de diferentes protocolos de LED, laserterapia de alta e baixa potência e PDT na reparação tecidual de excisões feitas em dorso de ratos diabéticos e não-diabéticos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Juliana Rodrigues de Castro, Luana Campos** e os pesquisadores **José Nicolau, Victor Elias Arana-Chaves**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **06.08.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

ANEXO B – Renovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEUA - FOUSP)

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

São Paulo, 14 de setembro de 2016.

CEUA/FOUSP/Of.30

Senhora Pesquisadora,

Informamos que a CEUA/FOUSP, em reunião ordinária realizada 12 de setembro de 2016, aprovou a solicitação de renovação do projeto "Análise do efeito de diferentes protocolos de LED, laserterapia de alta e baixa potência e PDT na reparação tecidual de excisões feitas em dorso de ratos diabéticos e não diabéticos", registrado sob o protocolo 86/2012 da CEUA/ICB aprovado em 10 de agosto de 2012, de autoria de Alyne Simões Gonçalves, Juliana Rodrigues de Castro, Luana de Campos, José Nicolau e Victor Elias Arana-Chavez.

Informamos ainda que na CEUA/FOUSP o projeto renovado foi registrado sob o número 012/2016 e tem validade de 03 anos.

Atenciosamente.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves
ODB