SAULO NANI LEITE

**“Fototerapia como estímulo à cicatrização de
úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse
oxidativo experimental”**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos,
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Leite, Saulo Nani
L525f Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras
cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo
experimental / Saulo Nani Leite; orientador Prof. Dr.
Marco Andrey Cipriani Frade. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Dislipidemia. 2. Dieta hiperlipídica. 3.
Estresse oxidativo. 4. Cicatrização de úlceras. 5.
Fototerapia. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Saulo Nani Leite

Título: "Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo experimental".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 14/03/14

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (Orientador)

Universidade de São Paulo - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Profª. Drª. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Universidade Estadual de Londrina - UEL

Resultado: aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Profª. Drª. Maria Beatriz Puzzi

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Resultado: aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Profª. Drª. Maria Cristina Foss de Freitas

Universidade de São Paulo - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Universidade de São Paulo - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Homologado em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus que me deu força, saúde e perseverança para enfrentar mais essa jornada difícil, porém gratificante.

Dedico também aos meus pais, José e Maria Lúcia, pelo amor e pela colaboração em concretizar esse importante objetivo.

Dedico em especial ao meu irmão Marcel pela ajuda incondicional e participação em todos os momentos deste desafio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai pelo dom da vida, a Deus Filho pelo companheirismo nos momentos mais difíceis e ao Espírito Santo pela inteligência e por iluminar sempre os meus caminhos.

Ao meu pai, José, pelo carinho, esforço e credibilidade no meu trabalho e minha mãe, Maria Lúcia, meu grande porto seguro nos momentos alegres e difíceis dessa longa caminhada.

A minha irmã Giselle pelo apoio, carinho, amizade e paciência incondicional.

Ao meu irmão Marcel pela ajuda incondicional durante este período, paciência, entrega, despojamento, disponibilidade, amizade, companheirismo. Que Deus sempre te ilumine e te abençoe meu irmão!

A minha esposa e amiga Estefânia que sempre me deu força e acima de tudo paciência durante a minha árdua dedicação a essa etapa profissional.

À benção que recebi de Deus, meu filho Gabriel, que me incentivou ainda mais a terminar esta etapa importante da minha carreira profissional.

Ao meu grande mestre, orientador, e acima de tudo meu amigo, Professor Marco Andrey, pelos ensinamentos, cooperação, confiança, carinho, zelo e amizade durante todo o tempo dessa árdua jornada.

Ao meu querido amigo e colega de trabalho Thiago Andrade, pela ajuda durante minha formação de pós graduando, obrigado pelo carinho, paciência, atenção, cooperação, incentivo ao longo de todos esses anos.

Aos amigos de orientação pertencentes ao grupo de cicatrização, Débora, Guilherme, Tânia, pela ajuda, amizade e apoio.

Aos funcionários do Biotério, Adalberto, Maurício e Roni, pela amizade e cuidado com os animais utilizados nos experimentos.

Ao Professor Alceu Jordão do Curso de Nutrição da FMRP-USP, pela cooperação e apoio durante os experimentos.

A técnica do Laboratório de Nutrição da FMRP-USP, Paula Payão, pelo carinho, atenção e grande cooperação nas dosagens de estresse oxidativo durante todos os experimentos.

A todas as pessoas da Divisão de Dermatologia da FMRP-USP, Dra. Norma Foss, Dra. Ana Roselino, Cristina, que colaboraram no meu processo de formação durante esse período.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia-USP, obrigado pela cooperação e amizade.

A empresa DMC (São Carlos, Brasil) e a Doutora Luciana Almeida-Lopes por terem cedido gentilmente o aparelho de laser *Lase III* para os experimentos.

RESUMO

LEITE, S.N. **Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo experimental.** 2014, 124f. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O estudo avaliou os efeitos da fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas e sua relação com estresse oxidativo experimental em ratos. Foram selecionados 80 ratos Wistar que foram divididos aleatoriamente em dois grupos de acordo com a dieta, controle e hiperlipídica (50% gordura) durante 45 dias. Posteriormente, foram avaliadas as concentrações séricas de glicemia, colesterol total, triglicérides, HDL e adiponectina, além da avaliação clínica e histopatológica dos fígados dos animais. Os animais normolipídicos (NL) e hiperlipídicos (HL) foram distribuídos em grupos (n=20) conforme tratamento fototerápico, a saber: aparelho desligado (*sham*) e ligado (laser diodo, 660 nm, 2 J, 70 J/cm², 100 mW) sendo designados NLL-, HLL-, NLL+ e HLL+ respectivamente. Duas úlceras cutâneas foram realizadas com *punch* 15 mm e irradiadas 3 vezes por semana durante 14 dias. As úlceras foram fotografadas e analisadas por meio do programa ImageJ e calculado os índices de cicatrização das úlceras (ICUs) no 2º, 7º e 14º dias, além da dosagem de hidroxiprolina para avaliação da colagênese e avaliação histopatológica (HE) qualitativa do processo cicatricial. Foram coletadas biópsias das lesões nos dias de seguimento para dosagens de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), peróxidos de hidrogênio (FOX), glutathiona reduzida (GSH) para avaliar o estresse oxidativo tecidual. Os resultados mostraram que após o período de dieta, os animais hiperlipídicos apesar de não apresentarem aumento na massa corporal, apresentaram aumento da glicemia (p=0,0001), colesterol total (p=0,0002), triglicérides (p=0,0001) e diminuição nos níveis de adiponectina (p=0,003) comparado ao grupo normolipídico. Além disso, apresentaram fígados com alterações clínicas e histopatológicas compatíveis com quadro de esteatose hepática. Em relação ao estudo da cicatrização, no 14º dia o grupo hiperlipídico apresentou atraso na reepitelização das úlceras (p=0,0001), diminuição da colagênese (p=0,0001), e na análise histopatológica qualitativa do 14º dia evidenciou pequena formação de epiderme, poucos fibroblastos e colágeno desorganizado em relação aos normolipídicos. Quanto ao estresse oxidativo, no 2º dia os animais hiperlipídicos apresentaram aumento nos níveis de MPO (p=0,0001), MDA no 2º e 14º dia (p=0,0003 e p=0,0001), FOX no 2º e 14º dia (p=0,01 respectivamente) e GSH no 2º dia (p=0,009) em relação aos normolipídicos. Em relação aos grupos irradiados, no 2º dia o grupo NLL+ apresentou maiores ICUs em relação ao HLL- (p<0,05) e o HLL+ apresentou maiores ICUs em relação aos controles NLL- e HLL- (p<0,05). No 14º dia o grupo NLL+ apresentou novamente maiores ICUs em relação ao HLL- e o grupo HLL+ apresentou maiores ICUs em comparação com o HLL- e NLL+ (p<0,05). Quanto à colagênese, no 7º dia o NLL+ apresentou aumento em relação aos demais grupos (p<0,05) e no 14º dia o NLL+ continuou apresentando aumento em comparação com os outros grupos e o HLL+ apresentou aumento em relação ao HLL- (p<0,05). Em relação ao estresse oxidativo, no 2º dia o grupo NLL+ apresentou aumento de MPO em relação aos grupos NLL- e HLL+ (p<0,05). No 7º

dia o grupo NLL+ apresentou diminuição nos níveis de MPO em comparação ao NLL- e o HLL+ apresentou diminuição em relação aos controles NLL- e HLL- ($p<0,05$). As dosagens de MDA no 2º dia mostraram que o grupo HLL+ apresentou menores índices em comparação ao HLL- e no 14º dia o NLL+ apresentou diminuição nos índices em relação ao HLL- ($p<0,05$). De acordo com as dosagens de FOX no 2º dia o NLL+ mostrou níveis elevados em comparação com os grupos NLL- e HLL+, e o grupo HLL+ mostrou níveis mais baixos em relação ao HLL- e NLL+ ($p<0,05$). Quanto as dosagens de GSH no 7º dia o grupo HLL+ apresentou níveis elevados em comparação aos demais grupos ($p<0,05$). Os resultados evidenciaram a influência negativa da dieta hiperlipídica nas concentrações séricas de glicemia, perfil lipídico, adiponectina e no fígado. Essas alterações metabólicas causaram ambiente de estresse oxidativo e diminuição da colagênese e atraso da reepitelização das úlceras cutâneas. Quanto à fototerapia, o grupo hiperlipídico irradiado acelerou a cicatrização de úlceras cutâneas por meio da modulação do estresse oxidativo em comparação ao grupo hiperlipídico não irradiado e aos grupos normolipídicos, sugerindo que efeitos benéficos similares podem ser encontrados em pacientes com alterações metabólicas.

Palavras-chave: Cicatrização de Úlceras; Dislipidemia; Dieta hiperlipídica; Estresse oxidativo; Fototerapia.

ABSTRACT

LEITE, S.N. **Phototherapy as stimulus for healing of cutaneous wounds in rats against experimental oxidative stress.** 2014 124 f. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The study evaluated the effects of phototherapy in the healing of skin ulcers and their relationship with oxidative stress in experimental rats. Eighty Wistar rats were divided were selected randomly into two groups according to diet, control diet and hyperlipidemic diet (50% fat) for 45 days. Subsequently, serum glucose concentrations were evaluated, cholesterol, total triglycerides, HDL and adiponectin, in addition to clinical and histopathological evaluation of liver animals. The normolipidemic (NL) and hyperlipidemic (HL) animals were divided into groups (n = 20) as phototherapy, namely laser *off* (*sham*) and laser *on* (laser diode, 660 nm, 2 J, 70 J/cm², 100 mW) being designated NLL-, HLL-, NLL+ and HLL+, respectively. Two skin ulcers were performed with a punch 15 mm and irradiated three times per week for 14 days. The ulcers were photographed and analyzed using the ImageJ program and calculated the rates of healing of ulcers in the 2nd, 7th and 14th days, besides the determination of hydroxyproline to evaluate collagenesis and histopathological evaluation (HE) qualitative healing process. Biopsies was collected on days of follow-up for determination of myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (FOX), reduced glutathione (GSH) to assess tissue oxidative stress. The results showed that after the diet period, the hyperlipidemic animals spite of not showing an increase in body mass, showed increased blood glucose levels (p = 0.0001), total cholesterol (p = 0.0002), triglycerides (p = 0.0001) and a decrease in adiponectin levels (p = 0.003) compared to normolipidemic group. Furthermore, livers presented with clinical and histopathological changes consistent with acute hepatic steatosis. Regarding the study of healing, on the 14th day hyperlipidemic group showed delay in re-epithelialization of ulcers (p = 0.0001), decreased collagenesis (p = 0.0001), and qualitative histopathological analysis of the 14th day showed a small neo epidermis, few fibroblasts and disorganized collagen in relation to normolipidemic rats. Regarding oxidative stress, on the 2nd day the hyperlipidemic animals showed increased levels of MPO (p = 0.0001), MDA in the 2nd and 14th day (p = 0.0003 and p = 0.0001), FOX in the 2nd and 14th day (p = 0.01, respectively) and GSH on day 2 (p = 0.009) compared to normolipidemic. Regarding the irradiated groups, on the 2nd day the NLL+ group had higher WHR compared to HLL- (p < 0.05) and HLL+ WHR were higher compared to NLL- and HLL- (p < 0.05) control groups. On the 14th day the NLL + group showed higher again ICUs compared to HLL and HLL+ group had higher ICUs compared with HLL and NLL + (p < 0.05). Regarding collagenesis, on the 7th day the NLL+ showed an increase compared to the other groups (p < 0.05), on day 14 the NLL+ continued to show an increase compared with the other groups and HLL+ showed an increase compared to HLL- (p < 0.05). In relation to oxidative stress, on the 2nd day the NLL+ group showed increased MPO in relation to HLL+ and NLL- (p < 0.05) groups. On the 7th day the NLL+ group showed a decrease in MPO levels in compared to the NLL-, and HLL+ showed a decrease compared to NLL+ and HLL- (p < 0.05) controls. Dosages of

MDA on day 2 showed that the HLL+ group had lower rates compared the HLL- and on day 14 the NLL+ showed a decrease in rates compared to HLL- ($p < 0.05$). Of according to FOX dosages on the 2nd day the NLL+ showed high levels compared with HLL+ and NLL- groups and HLL+ showed lower levels compared to the HLL- and NLL+ ($p < 0.05$). As the dosage of GSH on the 7th day the HLL+ group showed high levels compared to other groups ($p < 0.05$). The results showed the negative influence of high-fat diet on serum glucose, lipid profile, adiponectin and liver. Those metabolic changes caused oxidative stress, decreased collagenesis and delay in re-epithelialization of cutaneous wounds. As for phototherapy, the group hyperlipidic irradiated accelerated the healing of skin ulcers by modulating oxidative stress in comparison to hyperlipidemic non-irradiated group and normolipidemic groups, suggesting that similar beneficial effects can be found in patients with metabolic disorders.

Key-Words: Dyslipidemia; High-fat diet; Oxidative stress; Phototherapy; Wound Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desequilíbrio entre úlceras agudas e crônicas	23
Figura 2: Funções dos macrófagos	27
Figura 3: Formação do estresse oxidativo	28
Figura 4: Esquema ilustrativo da ação principal da radiação monocromática visível e infravermelho próximo na célula	42
Figura 5: Aparelho <i>Flash Lase III</i>	55
Figura 6: (A) : Suporte padronizado para captura de imagens. (B) : Posicionamento do animal para a captura de imagens das úlceras cutâneas dorsais	57
Figura 7: Esquema ilustrativo da análise das áreas das úlceras através do programa ImageJ (A) Delimitação da área da úlcera (B) Colocação da escala (C) Resultado da área em milímetros	58
Figura 8: Massa corporal (g) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	64
Figura 9: Valores da glicemia (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	65
Figura 10: Valores do colesterol total (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	65
Figura 11: Valores de triglicerídeos (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	65
Figura 12: Valores de HDL (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	66
Figura 13: Valores de adiponectina dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento	66
Figura 14: Aspecto clínico do fígado dos ratos dos grupos normolipídicos (A) e hiperlipídicos (B)	66
Figura 15: Micrografia do tecido hepático dos ratos dos grupos normolipídicos (A) hiperlipídicos (B). (coloração HE, aumento 100x)	67
Figura 16: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos (A) e hiperlipídicos (B) no 2º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	68
Figura 17: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos (A) e hiperlipídicos (B) no 7º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	68

Figura 18: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos (A) e hiperlipídicos (B) no 7º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	68
Figura 19: Índice de cicatrização das úlceras (ICUs) dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	69
Figura 20: Dosagens de hidroxiprolina dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	69
Figura 21: Dosagens de MPO dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	70
Figura 22: Dosagens de MDA dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	71
Figura 23: Dosagens de FOX dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	71
Figura 24: Dosagens de GSH dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento	72
Figura 25: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- (A), NLL+ (B), HLL- (C) e HLL+ (D) no 2º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	73
Figura 26: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- (A), NLL+ (B), HLL- (C) e HLL+ (D) no 7º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	74
Figura 27: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- (A), NLL+ (B), HLL- (C) e HLL+ (D) no 14º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)	74
Figura 28: Índices de cicatrização das úlceras (ICUs) dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dia de acompanhamento	75
Figura 29: Avaliação dos níveis de hidroxiprolina nos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dia de acompanhamento	76
Figura 30: Dosagens de MPO na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento	76
Figura 31: Dosagens de MDA na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento	77
Figura 32: Dosagens de FOX na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento	78
Figura 33: Dosagens de GSH na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas dos grupos controle e hiperlipídico.....	53
--	----

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
APN	Adiponectina
ATP	Adenosina Trifosfato
Af	Área final
Ai	Área inicial
AsGa	Arseneto de Gálio
AsAlGa	Arseneto de Gálio Aluminizado
CAT	Catalase
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm ²	Centímetros quadrados
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
<i>EGF</i>	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Método de Ligação Imunoenzimática)
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<i>FOX</i>	<i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>HARP</i>	<i>Heparin Affinity Regulatory Peptide</i> (Peptídeo Regulador de Afinidade da Heparina)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> /Lipoproteínas de baixa densidade

HE	Hematoxilina e Eosina
HeNe	Hélio-Neônio
ICU	Índice de Cicatrização das Úlceras
<i>IFN</i>	Interferon
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
J	Joule
<i>KGF</i>	<i>Keratinocytes Growth Factor</i> (Fator de crescimento de Queratinócitos)
<i>LAS</i>	<i>Leica[®] Application Suite</i>
<i>LASER</i>	<i>Light Amplification Stimulated Emission Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
<i>LED</i>	<i>Light Emission Diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
<i>MCP-1</i>	<i>Monocytes Chemoattractive Protein-1</i> (Proteína-1 Quimioatrativa de Monócitos)
MEC	Matriz Extracelular
<i>MMP</i>	<i>Matrix Metaloproteinase</i> (Metaloproteinase da Matriz)
MPO	Mieloperoxidase
mW	MiliWatts
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
<i>PDAF</i>	<i>Platelet Derived Angiogenesis Factor</i> (Fator de Angiogênese Derivado de Plaquetas)
<i>PDEGF</i>	<i>Platelet Derived Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial Derivado de Plaquetas)
<i>PDGF</i>	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
<i>PF-4</i>	<i>Platelet Factor-4</i> (Fator Plaquetário-4)

<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
<i>ROS</i>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécie Reativa de Oxigênio)
<i>SOD</i>	Superóxido dismutase
<i>TBA</i>	Ácido tiobarbitúrico
<i>TGF-α</i>	<i>Transforming Growth Factor α</i> (Fator α Transformador de Crescimento)
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Fator de Necrose Tumoral- α)
<i>USP</i>	Universidade de São Paulo
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Vásculo-Endotelial)

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	20
1 – Úlceras cutâneas	21
2 – Úlceras agudas e crônicas	21
3 – O processo de cicatrização	22
3.1 – Lesão	23
3.2 – Coagulação	23
3.3 – Inflamação	24
3.3.1 – Estresse celular e mecanismos de defesas antioxidantes	26
3.3.2 – Marcadores do estresse celular e dos mecanismos de defesas antioxidantes	29
3.4 – Formação Tecidual	31
3.5 – Remodelagem Tecidual	34
4 – Alterações metabólicas e cicatrização cutânea	35
5 – Laserterapia de baixa potência	37
5.1 – <i>Laser</i>	38
5.2 – Mecanismos da fotobioestimulação	39
5.3 – Fototerapia na cicatrização de úlceras em modelos experimentais patológicos	42
5.3.1 – Fototerapia em modelos patológicos <i>in vitro</i>	43
5.3.2 – Fototerapia em modelos patológicos <i>in vivo</i>	44
5.3.3 – Fototerapia em modelos humanos associados a condições patológicas	45
II – JUSTIFICATIVA	46
III – OBJETIVOS	49

IV – ANIMAIS E MÉTODOS	51
1 – Seleção dos animais	52
1.2– Padronização das dietas controle e experimental	52
1.3 – Confirmação do estado nutricional	53
1.3.1 – Massa corporal	53
1.3.2 – Dosagem dos níveis glicêmicos	53
1.3.3 – Perfil lipídico dos animais	53
1.3.4 – Determinação dos níveis plasmáticos de adiponectina	53
1.3.5 – Avaliação hepática	53
1.4 – Procedimento cirúrgico	54
1.5 – Aparelho de fototerapia	54
1.6 – Padronização dos grupos	54
1.7 – Padronização do procedimento da fototerapia	55
1.8 – Eutanásia e dias de seguimento das avaliações	55
1.9 – Captura e análise de imagens	55
1.10 – Avaliação da cicatrização das úlceras	56
1.11 – Coleta do material para estudo	58
1.12 – Estudo do estresse celular e defesas antioxidantes	58
1.12.1 – Dosagem de mieloperoxidase (MPO)	59
1.12.2 – Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS -“Thiobarbituric Acid Reactive Substances”)	59
1.12.3 – Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)	60
1.12.4 – Determinação da glutatona reduzida (GSH)	60
1.12.5 – Determinação das proteínas totais	60
1.13 – Dosagem de hidroxiprolina	61

1.14 – Análise Estatística	61
V – RESULTADOS	63
1 – Resultados do artigo intitulado: ‘Influência do estresse oxidativo experimental na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos’	64
1.1 – Confirmação do modelo experimental	64
1.2 – Estudo histopatológico da cicatrização	67
1.3 – Evolução do processo de reepitelização	69
1.4 – Indução da colagênese	69
1.5 – Estresse oxidativo	70
1.6 – Defesas antioxidantes	72
2 – Resultados do artigo intitulado: ‘Fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo experimental’	72
2.1 – Estudo histopatológico da cicatrização	72
2.2 – Estudo da reepitelização	75
2.3 – Indução da colagênese	75
2.4 - Estudo do estresse oxidativo e defesas antioxidantes	76
VI – DISCUSSÃO	79
VII – CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES	112
Apêndice A	113
Apêndice B	121
ANEXOS	123
Anexo A	124
Anexo B	125

Introdução

1 – Úlceras cutâneas

A formação de uma úlcera cutânea ocorre após qualquer ruptura na solução de continuidade do tecido cutâneo-mucoso atingindo a camada epidérmica e pelo menos a derme papilar, alterando a estrutura anatômica e/ou fisiológica dos tecidos afetados. Uma vez que a pele é rompida, a lesão pode progredir rapidamente a uma úlcera profunda e extensa (JAUL, 2009).

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial e o consequente incremento da população idosa tornou-se rotineiro o atendimento de pacientes idosos apresentando lesões ulceradas de múltiplas etiologias como úlceras venosas, arteriais, diabéticas além das úlceras de pressão devido ao repouso prolongado consequente das doenças degenerativas. Além disso, adultos jovens que apresentam distúrbios metabólicos e sofrem procedimentos cirúrgicos ou traumas, são susceptíveis a desenvolver úlceras crônicas (WILSON; CLARK, 2004). A maioria das úlceras é causada por isquemia secundária a estase venosa, pressão e diabetes mellitus. Úlceras que não cicatrizam, principalmente em pacientes idosos, podem tornar-se crônicas por anos ou mesmo levar estes pacientes a óbito (MENKE et al., 2007; JAUL, 2009).

2 - Úlceras agudas e crônicas

A cicatrização é um processo biológico complexo onde ocorrem eventos de maneira coordenada e seqüencial envolvendo interações de vários tipos celulares, componentes da matriz, proteases, fatores de crescimento e citocinas (GURTNER et al., 2008; SINNO; PRAKASH, 2013). As úlceras agudas como as cirúrgicas e traumáticas cicatrizam normalmente durante esses eventos de modo organizado e rápido. Elas geralmente cicatrizam por primeira intenção, minimizando o volume de tecido conjuntivo depositado, gerando mínima formação de cicatriz e restaurando a barreira epitelial contra infecções (BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004). Já as crônicas, geralmente se desenvolvem devido à ocorrência de falhas na ordem e no tempo do processo de cicatrização (EAGLESTEIN; FALANGA, 1997; ROBSON; BARBUL, 2006).

Na fase inflamatória das úlceras agudas, ocorre um equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias fazendo com que o processo inflamatório seja limitado, diferente das úlceras crônicas onde há um processo inflamatório persistente. A cascata inflamatória é alterada envolvendo citocinas exógenas e

fatores de crescimento que promovem um desequilíbrio degradativo na úlcera (Figura 1). Ocorre também alteração no ambiente molecular interrompendo o ciclo inflamatório normal (CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004; MENKE et al., 2007; BEHM et al., 2012).

As úlceras crônicas como, por exemplo, as úlceras venosas, arteriais, diabéticas, e neuropáticas cicatrizam por segunda intenção de forma desordenada e com atraso no reparo, podendo vários fatores alterar o processo normal de cicatrização, como idade, infecções, desnutrição, doenças cardiovasculares resultando em hipóxia, fumo, traumas, *diabetes mellitus*, entre outras (BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; SINNO, PRAKASH, 2013).

Figura 1: Desequilíbrio no processo de cicatrização entre as úlceras agudas e crônicas (MENKE et al., 2007).

3 - O processo da cicatrização

O processo de cicatrização cutânea basicamente envolve três fases e cada uma delas apresenta eventos celulares característicos. As fases sequenciais são a inflamatória, proliferativa e remodelação tecidual. Alguns autores dividem didaticamente a fase inflamatória em **lesão**, **coagulação** e **inflamação** (CHETTIBI; FERGUSON, 1999; BEANNES et al., 2003) porém, esses eventos ocorrem simultaneamente na fase inflamatória. Todo o processo de reparação é formado por uma complexa série de reações e interações célula-célula e célula-matriz, bem como a interação indireta entre diferentes populações celulares através de mediadores solúveis. O equilíbrio entre mediadores estimulatórios e inibitórios durante o processo de cicatrização é essencial para alcançar a homeostasia tecidual pós-lesão (EMING et al., 2007; GURTNER et al., 2008; LEE et al., 2012; SINNO; PRAKASH, 2013).

3.1 - Lesão

O rompimento da solução de continuidade tecidual proporciona um extravasamento de sangue no local da lesão através dos vasos danificados. Aminas vasoativas como a histamina, serotonina e outros mediadores aumentam a permeabilidade vascular para permitir a transmigração de células como neutrófilos, monócitos, linfócitos, plaquetas, e proteínas plasmáticas como fibronectina e fibrinogênio, ao sítio da lesão. Esses fenômenos acontecem devido interação dinâmica de citocinas e fatores liberados pelas células, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β), sendo responsáveis pela síntese de matriz extracelular (BEANNES et al., 2003; DIEGELMANN; EVANS, 2004).

3.2 - Coagulação

A coagulação ou hemostasia ocorre logo após a lesão sendo as plaquetas e fibrina os dois principais componentes do processo. As plaquetas são as primeiras células que aparecem após a lesão e têm papel central no processo de hemostasia (LI et al., 2007; LEE et al., 2012).

Com a lesão vascular o extravasamento de sangue por todo o leito da lesão permite ativação das plaquetas através do contato com os componentes da matriz extracelular tais como colágeno fibrilar, fibronectina e outras proteínas adesivas da matriz. Após ativação, as plaquetas são submetidas à adesão e agregação e ao mesmo tempo liberam vários mediadores como histamina, serotonina, adenosina difosfato (ADP), tromboxano A_2 , prostaglandinas 2-alfa e proteínas adesivas como fibrinogênio, fibronectina, trombospodim, e fator von Willebrand (fator VIII). Esses mediadores induzem agregação plaquetária que juntamente com a conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina, forma-se um coágulo de fibrina para evitar a perda de sangue (BEANNES et al., 2003; LI et al., 2007; SINNO; PRAKASH, 2013).

A agregação plaquetária ativa o fator de Hageman (fator XII) que inicia a cascata de coagulação intrínseca através de uma série de conversões de pro-enzimas em enzimas ativadas que culminam na transformação de pró-trombina em trombina. O tecido lesado libera uma lipoproteína chamada fator tecidual que ativa a cascata de coagulação extrínseca. Os monócitos e células endoteliais também

expressam esse fator tecidual em sua superfície contribuindo no processo de coagulação (BARANOSKI; AYELLO, 2004; LI et al., 2007).

Além de sua participação crucial na hemostasia, as plaquetas também contribuem significativamente com outros processos na cicatrização, incluindo inflamação, reepitelização, fibroplasia e angiogênese. O coágulo de fibrina atua como matriz provisória para migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, servindo também como reservatório de fatores de crescimento tais como PDGF, TGF- α e TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), β tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF-4) e fator de angiogênese derivado de plaquetas (PDAF) (STADELMAN et al, 1998), sendo que os mais importantes são o PDGF e o TGF- β .

O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, células de músculo liso e fibroblastos. Além disso, estimula a mitogênese de fibroblastos e células de músculo liso. Já o TGF- β adiciona outro sinal importante para o início da cascata da cicatrização por atrair macrófagos e os estimular a secretar citocinas adicionais incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, TNF- α e IL-1 β (DIEGELMANN; EVANS, 2004; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). Células inflamatórias são quimiotaticamente atraídas ao reservatório de moléculas armazenadas no coágulo, o que inicia a inflamação, a próxima etapa na sequência do processo de cicatrização (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

3.3 - Inflamação

A fase inflamatória é caracterizada por um influxo de leucócitos para a área da lesão. Dentro de poucas horas pós-lesão, grande quantidade de neutrófilos atravessam o endotélio dos capilares sanguíneos, ativados por citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α), e interferon γ (IFN- γ) para a área lesionada, levando a expressão de moléculas de adesão e rolamento dos leucócitos. As moléculas de adesão presentes na superfície das células endoteliais como as P-selectinas e E-selectinas, assim como ICAM-1 e ICAM-2, são cruciais no processo de rolamento (EMING et al., 2007). Essas moléculas interagem com as integrinas presentes na superfície dos neutrófilos incluindo CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95), CD11d/CD18. Quimiocinas e seus receptores incluindo interleucina 8 (IL-8), oncogene α relacionada com o crescimento, e proteína-1 quimioatrativa de

monócitos (MCP-1), também são essenciais para o recrutamento dos neutrófilos, assim como os produtos bacterianos e lipopolissacarídeos que acumulam na lesão infectada podendo acelerar o recrutamento de neutrófilos para a lesão (SHERWOOD et al., 2004; ESCHE et al., 2005).

Os neutrófilos recrutados iniciam o desbridamento do tecido lesionado e fagocitose de agentes infecciosos liberando várias substâncias antimicrobianas (espécies reativas derivadas do oxigênio (*ROS*), peróxidos de hidrogênio, peptídeos catiônicos, eicosanóides) e proteinases (elastases, catepsina G, proteinase 3). Os neutrófilos têm meia vida curta, mas havendo processo infeccioso na lesão a presença dos neutrófilos pode prolongar podendo comprometer a cicatrização (EMING et al., 2007; SINNO; PRAKASH, 2013).

Os monócitos são inicialmente atraídos para a área da lesão por sinais liberados por quimiocinas específicas como MCP-1 e proteína 1 de macrófagos inflamatórios. Os produtos de degradação da matriz extracelular, fragmentos de colágeno, de fibronectina, e trombina são quimioatraentes específicos para monócitos. Na área da lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos geralmente em torno de 48 a 96 horas pós trauma. Os macrófagos são considerados a célula regulatória mais importante da reação inflamatória, com papel importante em todas as fases da cicatrização (SINNO; PRAKASH, 2013) (Figura 2). Eles fagocitam, digerem, e destroem organismos patógenos, removem *debris* celulares e neutrófilos remanescentes. Esses processos importantes realizados por monócitos/macrófagos permitem induzir a angiogênese e formação do tecido de granulação (LEWIS et al., 1999).

Figura 2: Importantes funções dos macrófagos em todas as fases do processo de cicatrização (WITTE, BARBUL, 1997).

Os macrófagos liberam fatores quimiotáticos (por exemplo, fibronectina) que atraem fibroblastos para a lesão. O crescimento de novos vasos sanguíneos segue um gradiente de fatores angiogênicos produzidos por macrófagos em hipóxia, pois macrófagos não produzem esses fatores angiogênicos quando estão totalmente oxigenados ou em anóxia. Os macrófagos também são considerados reservatórios de fatores de crescimento incluindo PDGF, TGF- α , TGF- β , FGF, fator de crescimento vículo-endotelial (VEGF), que promovem migração, proliferação celular e síntese de matriz extracelular (FALANGA, 1999). Os macrófagos ativados são importantes na transição para a fase proliferativa da cicatrização (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING et al., 2007; LI et al., 2007; BEHM et al., 2012; SINNO; PRAKASH, 2013).

3.3.1 – Estresse celular e mecanismos de defesas antioxidantes

A pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, sendo que há um

equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando assim ao chamado estresse oxidativo (RASILAINEN et al., 2002; SCHAFER; WERNER, 2008) (Figura 3). Atualmente, é amplamente aceito que aumento nos níveis de ROS e outros mediadores do estresse oxidativo possuem papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, patologias neuro-degenerativas, assim como, doenças inflamatórias crônicas envolvendo processo crônico de cicatrização (NOVO; PAROLA, 2012).

Figura 3 – **(A)** O estresse oxidativo existe quando há um excesso de radicais livres sobre as defesas antioxidantes. Como consequência, os radicais atacam e oxidam outros componentes celulares principalmente os lipídios (principalmente os poli insaturados), proteínas e ácidos nucléicos. Isso leva a uma lesão tecidual e, em alguns casos, o influxo de células inflamatórias para o local da lesão (KELLY, 2003) **(B)** Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa.

Fonte: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007

Dentre as ROS formadas na pele, podemos destacar os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os radicais peroxila e alcoxila ($\text{RO}_2\cdot$ e $\text{RO}\cdot$), o oxigênio

singlete ($^1\text{O}_2$) (BEAK et al., 2004; KING BA; OH DH, 2004; WEI et al., 1998) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das ROS, também estão envolvidas em processos de redox celular, outras espécies intermediárias, as RNS, tais como $\bullet\text{NO}$ e espécies reativas de enxofre, com importância biológica significativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies citadas pode sofrer ação de agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo. Este, por sua vez, pode ser restabelecido pelos sistemas antioxidantes presentes no tecido cutâneo. O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997). A CAT e a GPx são as principais responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 . A GPx, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada (GSSG) (ROVER-JR; KUBOTA; HÖEHR, 2001).

Os antioxidantes não enzimáticos, ou de baixo peso molecular também contribuem com a manutenção do balanço redox celular. Nesta classe inclui-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com as ROS (BIALY et al., 2002).

Dentre as substâncias endógenas podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno que apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina E, devido, provavelmente, à sua porção fenólica, comum a ambas as moléculas (KVAM; DAHLE, 2003) e à melatonina, reguladora do relógio biológico nos mamíferos, que também apresenta atividade antioxidante, além de induzir a síntese de antioxidantes enzimáticos *in vivo*, como a glutathione peroxidase (REITER, 1997; SLOMINSKI et al., 2002). Destaca-se também o ácido lipóico, um cofator essencial em vários complexos enzimáticos que apresenta atividade antioxidante e que pode atuar como regenerador de formas oxidadas de glutathione, ascorbato e α -tocoferol (PODDA et al., 2001); bem como a melanina, um pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel protetor contra a radiação UV, que

também possui papel antioxidante, protegendo a pele principalmente contra O_2^- e RO_2 (SERGEEV; UKHINA; SHIMANOVSKIĬ, 1999).

Além de todo o sistema antioxidante endógeno exemplificado, a pele conta ainda com um eficiente mecanismo de reparo, caso os danos já tenham ocorrido, envolvendo enzimas e substâncias de baixo peso molecular (ICHIHASHI et al., 2003). Por exemplo: lesões oxidativas em DNA podem ser identificadas por enzimas específicas, removidas e reparadas (KROKAN et al., 1997), ou ainda, substâncias que sofreram ataque de radicais podem ser restauradas pela doação de hidrogênio de outras moléculas (ICHIHASHI et al., 2003).

A aplicação tópica ou oral de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, buscam-se novas substâncias com ação antioxidante, bem como substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes. Alguns antioxidantes fundamentais são normalmente adquiridos pela dieta, como por exemplo, as vitaminas C e E, os carotenóides e substâncias fenólicas derivadas de plantas. A vitamina E, ou α -tocoferol, além de estabilizar as bicamadas lipídicas no estrato córneo, é um dos mais importantes inibidores da peroxidação lipídica em animais, por capturar $RO_2^\bullet$ (BURTON et al., 1998).

3.3.2 – Marcadores do estresse celular e dos mecanismos de defesas antioxidantes

Devido à meia vida curta da ROS, suas concentrações *in vivo* são difíceis de determinar. Em vários estudos, os níveis de ROS têm sido determinados indiretamente por meio da análise de produtos da peroxidação lipídica, níveis de hidroperóxido lipídico, vitaminas (A e E) e antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione (MUDGE et al., 2002; MOSELEY et al., 2004; VINHA, 2008; SCHÄFER, WERNER, 2008).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para

avaliar o estresse oxidativo (LIMA, ABDALLA, 2001; GUPTA et al., 2002). Especialmente o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo. É o principal indicador da peroxidação lipídica determinado por titulação contra o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é indicador de dano celular. O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm e fluorescência em 553 nm. Associado com esse indicador, a mieloperoxidase é envolvida não somente na geração de ROS, mas também na ativação da atividade inflamatória (VASCONCELOS et al., 2007). A oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pode iniciar-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna das mitocôndrias gerando consequências homeostáticas graves para as membranas atacadas, principalmente na perda de sua integridade devido a alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989). Esta agressão acaba por interferir em mecanismos celulares importantes, incluindo sistemas enzimáticos, expressão gênica, entre outros (CREMONESE et al., 2001).

O método de *Ferrous Oxidation-Xylenol Orange* (FOX) foi originalmente desenvolvido para determinar o nível hidroperóxido lipídico em sistemas biológicos. O íon ferroso (Fe^{2+}) é oxidado pelo hidroperóxido (oxidante) para formar o íon férrico (Fe^{3+}). Este é, em seguida, tratado com o reagente xylenol-orange (XO) formando o complexo Fe^{3+} – XO (cor azul violeta) que é detectado por espectrofotômetro a 550 nm. Esse método é utilizado para determinar a formação ou presença de hidroperóxido na amostra biológica, atividade da lipoxigenase bem como o estudo da peroxidação lipídica. É menos reativo ou não reage a endoperóxidos (JIANG et al., 1992; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Os sistemas de defesa antioxidante nas células incluem compostos como a GSH, sendo o tiol mais abundante envolvido no sistema de defesa antioxidante ativado diretamente para remoção de ROS (FEOLI et al., 2006). Há também enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S transferase (GST). A GSH e essas enzimas servem como biomarcadores para a defesa antioxidante devido às suas habilidades de eliminar e atenuar os efeitos das ROS.

A GSH é envolvida em um grande número de processos funcionais, celulares, principalmente quanto a sua participação em algumas reações de detoxificação. Por atuar na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos, concentrações baixas de GSH estão associadas a um maior risco de estresse oxidativo e à ocorrência de infecções oportunistas (MESTER,1995; SHÄFER, 2008).

Enfim, a fase inflamatória da cicatrização tem como objetivo o recrutamento de células inflamatórias e produção de radicais livres que atuam no o desbridamento tecidual e produção de fatores de crescimento essenciais para a fase de proliferação tecidual.

3.4 - Formação tecidual

A resposta inflamatória inicial à lesão promove uma estrutura necessária para a produção de uma nova barreira funcional. Essa fase, também chamada de proliferativa, se inicia geralmente três dias pós-lesão e é marcada por uma intensa atividade celular e migração de diferentes tipos celulares para a região lesada. Os maiores eventos dessa fase são a formação do “tecido de granulação”, devido a aparência granular gerada pelos capilares neoformados, e a reepitelização. Essa granulação é formada por dois mecanismos, a formação de novos vasos (angiogênese), proliferação e migração dos fibroblastos para a lesão (fibroplasia) (KARUKONDA et al., 2000; LI et al., 2007; BEHM et al., 2012).

A granulação tecidual forma-se mediante ação de fatores de crescimento específicos que são secretados por células parenquimatosas lesadas e por monócitos e macrófagos. Os macrófagos, os fibroblastos e os vasos sanguíneos são importantes agentes que atuam de maneira interdependente nos interior da lesão durante este processo. Os macrófagos por serem uma fonte contínua de fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia e a angiogênese, os fibroblastos por atuarem na construção da nova matriz extracelular que dará suporte para a chegada de células de reparo e os vasos sanguíneos neoformados por transportarem oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular que nesta fase é intenso. Assim, o processo de granulação tecidual ocorre como consequência dos mecanismos de fibroplasia e angiogênese (KARUKONDA et al., 2000).

A fibroplasia traduz-se pela proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da lesão por estímulo de fatores de crescimento como PDGF, fator

básico de crescimento de fibroblasto (b FGF), EGF e TGF- β . A expressão do PDGF pelos fibroblastos é amplificada pela sinalização autócrina e parácrina (BROUGHTON; JANIS, 2006). Os fibroblastos que já estão na área lesionada, começam a sintetizar colágeno e se diferenciarem em miofibroblastos (induzidos pelo TGF- α secretado pelos macrófagos), para a contração da lesão (BROUGHTON; JANIS, 2006; LI et al 2007). Essa contração cicatricial mediada pelos miofibroblastos é estimulada por 5-hidroxitriptofano, prostaglandina $F_{1\alpha}$, angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina ou norepinefrina e, também, por participação do TGF- β (KARUKONDA et al., 2000).

À semelhança das células epiteliais, os fibroblastos migram para a lesão valendo-se de alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana celular ao acaso, chamados lamelopódios, que são análogos dos pseudópodos das células epiteliais em migração (GIANCOTTI et al., 1990; CHAN et al., 1992). Uma vez no interior da lesão, os fibroblastos interagem com os elementos da MEC (matriz extracelular) sintetizando, depositando e remodelando-a. Os fibroblastos assumem uma nova função que é a de sintetizar proteínas (STADELMANN et al., 1998; BROUGHTON; JANIS, 2006). Gradualmente estas células mudam seu fenótipo migratório para um fenótipo profibrótico, que começa pela dispersão do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi pelo citoplasma até apresentarem abundante retículo endoplasmático rugoso e Golgi repleto de novas proteínas representadas pelos colágenos. A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF- β . O colágeno é o principal alicerce do tecido conectivo e é formado por uma hélice tripla de cadeias de polipeptídeos α , com uma seqüência de repetição de gly-x-y. A combinação das 3 cadeias formam uma unidade básica de colágeno chamada tropocolágeno. Os filamentos de colágeno são feitos de subunidades de tropocolágeno, que por sua vez se combinam para formar as fibrilas colágenas que se agregam para formar as fibras de colágeno (STADELMANN et al., 1998; KUMAR et al., 2005).

A angiogênese é um processo de grande importância na formação do tecido de granulação. Ela se refere ao crescimento de novos vasos a partir do brotamento de vasos pré existentes adjacentes à área lesada envolvendo uma série de mecanismos complexos dependentes da MEC local, bem como de alterações

fenotípicas e fatores mitogênicos estimuladores de células endoteliais, que são elementos protagonistas deste processo (ARNOLD; WEST, 1991). A célula endotelial é a principal da angiogênese e surge de vasos e capilares lesados. Elas saem desses vasos, degradam e invadem a matriz provisória da lesão formando um “broto”. Esses brotos se estendem e conectam a outro capilar para formar uma rede vascular permitindo a circulação do sangue (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogênese como FGF (α e β), EGF, TGF- α , PDGF, TGF- β , VEGF, fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF) e peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991).

A reepitelização é o processo de restauração da epiderme após a lesão, envolvendo vários processos incluindo a migração e proliferação de queratinócitos da epiderme adjacente para a área da lesão, a diferenciação do novo epitélio em epiderme estratificada, e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme com a derme subjacente (LI et al., 2007).

A migração dos queratinócitos é iniciada a partir de uma resposta à lesão epidérmica, migrando das bordas para o centro da lesão. Vários elementos estão ligados à migração dos queratinócitos como a matriz extracelular, receptores de integrina, metaloproteinases da matriz (MMP's), e citocinas inflamatórias. IL-1 β e TNF- α regulam o gene de expressão do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) em fibroblastos que por outro lado sintetizam e secretam KGF-1, KGF-2 e IL-6 que estimulam os queratinócitos vizinhos para migrarem para a lesão, proliferarem e se diferenciarem para formar a epiderme (BROUGHTON; JANIS, 2006; WERNER et al., 2007). Os queratinócitos utilizam seus receptores de integrina para interagir com a matriz provisional rica em fibronectina, fibrina e colágeno tipo V. Esses receptores interagem com as moléculas de colágeno neoformado na lesão regulando a direção da migração dos queratinócitos. Os queratinócitos que estão migrando, produzem MMP's como a MMP-9 que especificamente degrada colágeno tipo IV e lamininas na membrana basal permitindo que células saiam da membrana e migrem para a lesão. Quando a migração cessa, os queratinócitos entram no substrato adjacente, reconstituem a membrana basal e retomam o processo terminal de diferenciação para gerar a epiderme estratificada. A formação de uma membrana basal derme-epiderme é essencial para o restabelecimento da integridade e função da pele. A membrana basal é formada por muitas proteínas da matriz extracelular, sendo o

colágeno e as lamininas os seus principais componentes. O colágeno IV é o mais abundante formando uma lâmina densa na membrana basal, e o colágeno VII também chamado de fibrilas de ancoragem, forma na derme papilar superior uma estrutura chamada placa de ancoragem. Já as lamininas são os maiores componentes não colagênicos da matriz extracelular de uma ampla variedade de membranas basais presentes nos tecidos humanos. As lamininas 5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$) e as lamininas 10 ($\alpha_5\beta_5\gamma_1$) são as maiores presentes na membrana basal da junção derme-epiderme e parecem participar ativamente da reparação tecidual (UITTO et al., 1997; PARKS, 1999; LI et al., 2007).

3.5 - Remodelagem tecidual

Na fase de remodelagem tecidual há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. Ocorre um equilíbrio entre formação de colágeno novo e degradação de colágeno velho através da ação das collagenases (KARUKONDA et al., 2000). Esse processo é também caracterizado pela redução gradual da celularidade e vascularidade (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. Ocorre uma remodelagem da matriz extracelular pelas metaloproteinases que incluem collagenases intersticiais, collagenase tipo IV e gelatinases. As principais citocinas envolvidas nesta fase são TNF- α , IL-1 β , PDGF, TGF- β produzidas pelos fibroblastos além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e TGF- β (KARUKONDA et al., 2000). Condições patológicas como o diabetes, aterosclerose, hipertensão, desnutrição protéico-energética dentre outras, podem causar problemas na deposição de matriz e colágeno comprometendo a força tênsil da lesão. Por outro lado, se houver excessiva síntese de colágeno, pode resultar em cicatriz hipertrófica ou quelóide (BROUGHTON; JANIS, 2006).

Na derme de indivíduos saudáveis, o colágeno tipo I é mais abundante que o colágeno tipo III, porém durante as fases precoces da cicatrização de feridas, ocorre um predomínio do colágeno III sintetizado pelos fibroblastos no tecido de granulação. Após período de um ano ou mais, a derme gradualmente retorna ao fenótipo pré-lesão estável, ocorrendo uma predominância do colágeno tipo I (LI et al., 2007). O colágeno da cicatriz, mesmo após um ano de maturação, não será tão organizado quanto o colágeno encontrado na pele não lesada. A força tênsil (uma

avaliação funcional do colágeno) da lesão alcança um nível máximo de 70% a 80% da força pré-lesão (STADELMANN et al., 1998; BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; LI et al., 2007).

A complexidade do processo de cicatrização de úlceras a torna vulnerável a diversos fatores que podem influenciar as fases do processo cicatricial, afetando as respostas fisiológicas e funções celulares. Tais fatores podem ser locais como, as infecções, alterações na oxigenação, fatores mecânicos (compressão de vasos), presença de corpos estranhos (fragmentos de aço ou vidro), e as características da lesão (tamanho, local, tipo), ou sistêmicos como a condição circulatória (aterosclerose), hormônios, nutrição (desnutrição protéico-energética) e **condição metabólica (*diabetes mellitus*, obesidade e síndrome metabólica)** (MACKAY; MILLER, 2003; BROUGHTON; JANIS, 2006; GUO; DIPIETRO, 2010; NASCIMENTO; MONTE-ALTO-COSTA, 2011; LITTLE, 2013). Estes distúrbios aumentam as concentrações de ROS e conseqüentemente alteram o processo de cicatrização cutânea. Nestes casos, a fase inflamatória torna-se prolongada, ocorrendo distúrbios no processo de angiogênese, diminuição do tecido de granulação e atraso na reepitelização. Além disso, alteram o redox celular provocando um ambiente de estresse oxidativo que leva a alterações celulares importantes (WLASCHEK, 2005; FEOLI, 2006, CURTI et al., 2011; LIU et al., 2011).

4 – Alterações metabólicas e cicatrização cutânea

O estilo de vida moderno caracterizado pela alta ingestão de alimentos e baixo nível de atividade física tem sido determinante para aumento da obesidade na humanidade. Dietas ricas em gordura causam alterações metabólicas que aumentam o ambiente de estresse oxidativo e conseqüentemente prejudica o processo cicatricial cutâneo (LI et al, 2010; NASCIMENTO; MONTE-ALTO-COSTA, 2011). O desenvolvimento de doenças metabólicas pode ser desencadeado pelo consumo excessivo de dieta hipercalórica e por isso vários estudos utilizam a dieta hiperlipídica no modelo animal para mimetizar as características apresentadas nessas alterações metabólicas em humanos (LAUTERIO et al., 1994; SWINBURN; EGGER, 2002; DIEMEN et al., 2006). Porém, a ingestão de tais dietas causam alterações metabólicas, mas não necessariamente geram quadros de obesidade (LAUTERIO et al., 1994). Muitas vezes, o indivíduo geneticamente apresenta resistência à obesidade, porém, apresenta um quadro dismetabólico que também

pode modificar o processo reparativo. Nascimento; Monte-Alto-Costa, 2011 avaliaram a cicatrização de úlceras cutâneas em ratos submetidos à dieta hiperlipídica durante 20 semanas. Após esse período, metade dos animais apresentou aumento do peso (grupo de ratos obesos) em relação ao grupo controle, porém, a outra metade apresentou peso similar ao controle (grupo de ratos resistentes). Independentemente do fato dos animais tornarem-se obesos, os dois grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram atraso na contração e reepitelização das úlceras. A dieta rica em gordura está relacionado a fatores dismetabólicos como, hiperglicemia, aumento do triglicérides, aumento no colesterol total, e diminuição de adipocinas como a adiponectina. Li et al., 2010 mostraram os efeitos dismetabólicos da dieta hiperlipídica (60% de gordura) em ratos durante 16 semanas. Após 8 semanas de dieta, os animais já apresentaram aumento da massa corporal, hipercolesterolemia e diminuição das concentrações de adiponectina (adiponectinemia) em comparação com o controle.

Segundo os estudos, a hipercolesterolemia gera um ambiente de estresse oxidativo e consequentemente acarreta distúrbios no processo normal de cicatrização (ROSEMBAUM et al., 2010; VILAHUR et al., 2012). Rosembaum et al., 2012 avaliaram os efeitos da hipercolesterolemia na cicatrização de lesão induzida na artéria carótida de camundongos. Os animais com hipercolesterolemia apresentaram aumento nos marcadores de estresse oxidativo (TBARS) e atraso no processo cicatricial das áreas lesadas arteriais.

Em relação à adiponectina, ela é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo com a função de modular o metabolismo de glicose e lipídios. Ela se apresenta em altas concentrações na circulação periférica e demonstra relação inversa com o aumento da gordura corporal, resistência à insulina e diabetes tipo II (TRUJILO; SCHERER, 2005). Recentemente, a adiponectina tem sido amplamente estudada como adjuvante no processo de cicatrização cutâneo. Salathia et al., 2013 utilizaram injeções com doses de adiponectina para tratamento de úlceras cutâneas em orelhas de camundongos. As úlceras tratadas com adiponectina apresentaram reepitelização mais rápida em comparação com o controle. Em outro experimento do mesmo estudo, foram induzidas úlceras dorsais em camundongos que foram tratadas com injeções de adiponectina. Os resultados mostraram que os animais tratados apresentaram colágeno mais denso e organizado após 10 dias de seguimento. Em contrapartida, Shibata et al., 2012 avaliaram o processo cicatricial

cutâneo de camundongos com deficiência de adiponectina. Os animais apresentaram atraso no processo cicatricial e diminuição na proliferação e migração de keratinócitos.

Portanto, em situações de estresse oxidativo gerado nas condições dismetabólicas (obesidade, diabetes, síndrome metabólica, etc) ocorre diminuição nos níveis de adiponectina (LI et al., 2010; CHEN et al., 2012) e consequentemente atraso no processo cicatricial cutâneo.

Atualmente, aumentaram as alternativas terapêuticas no mercado para a cicatrização de úlceras. A fototerapia (*laser* de baixa intensidade, por exemplo) vem sendo utilizada através dos anos, na tentativa de melhorar e acelerar o processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em modelos experimentais e estudos clínicos em humanos. Apesar da grande quantidade de trabalhos relacionados sobre o assunto, recentemente, os estudos apontam para a relação dos efeitos da fototerapia em ambiente de estresse oxidativo tecidual.

5 - Laserterapia de baixa potência

Os primeiros trabalhos sobre laserterapia de baixa potência ou baixa intensidade (então chamada de “bioestimulação com *laser*”) apareceram há mais de trinta anos. Nas décadas de 60 e 70, doutores da Europa Oriental, principalmente soviéticos e húngaros, desenvolveram ativamente a bioestimulação com *laser*. Os primeiros relatos de aplicações clínicas da bioestimulação com *laser* foram apresentados pelo húngaro Endre Mester, em 1966, que utilizou *lasers* de rubi na cicatrização de úlceras crônicas de membros inferiores. Contudo, o *laser* de hélio-neônio (HeNe) foi o primeiro aparelho de luz coerente comercialmente viável, sendo amplamente utilizado por vários pesquisadores, em estudos experimentais e em humanos. Acreditava-se que os efeitos bioestimulatórios observados pelo *laser* HeNe (a luz vermelha em particular) eram atribuídos a uma única propriedade: a alta coerência (unidirecionalidade) dessa irradiação (KARU, 1989). A partir daí, cientistas do mundo todo começaram a pesquisar e debater sobre a credibilidade dos estudos da ação do *laser* visível de baixa potência no organismo a nível molecular. Vários pontos da bioestimulação com *laser* que eram de grande interesse na época, começaram a ser analisados e elucidados em revisões que apareceram nos anos 80 (MESTER et al., 1985; LOBKÖ et al., 1985; KARU, 1987; KARU, 1989). Esses trabalhos começaram a mostrar que os efeitos no tecido até então atribuídos ao

fenômeno da bioestimulação com *laser*, eram na verdade a interação da luz (não coerente) com o material biológico. Sendo assim, a irradiação com a luz visível monocromática na região do azul, vermelho e ao infravermelho próximo, pode aumentar o processo de metabolismo nas células (KARU, 1987; KARU, 1988, KARU, 1989). Quando a luz atinge o tecido, ela pode ser refletida, espalhada ou absorvida, sendo que somente a luz absorvida vai interagir com o tecido sendo que a quantidade de luz absorvida e espalhada nos tecidos superficiais afeta a profundidade da radiação. Portanto a interação da fotoestimulação com o tecido depende do comprimento de onda (monocromaticidade), largura do pulso, densidade de potência (intensidade) e dose (fluência ou densidade de energia) da luz (COTTON, 2004).

Os lasers de baixa potência continuam sendo amplamente utilizado em experimentação e ensaios clínicos, utilizando vários protocolos diferentes de dose, intensidade e comprimento de onda. Atualmente a terapia com *laser* de baixa potência ou fotobioestimulação é considerada parte da fototerapia, bem como parte da fisioterapia. A fototerapia é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos e atualmente o uso dos *lasers* representa o avanço do desenvolvimento tecnológico da fototerapia (KARU, 2003).

5.1 - Laser

A palavra *LASER* é o acrônimo do inglês de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação. É uma forma de energia eletromagnética luminosa, visível ou não, que se caracteriza por sua frequência, amplitude e comprimento de onda (COSTA, 2002). Essas emissões de luz estão organizadas segundo o que se chama de “espectro de radiações eletromagnéticas”. Esse espectro é composto entre outras, de radiações vermelhas, infravermelhas e ultravioletas, e o que diferencia o tipo de radiação emitida são os comprimentos de onda, ou seja, para identificar em que parte do espectro está uma determinada radiação é necessário saber o comprimento de onda dessa radiação (ALMEIDA-LOPES; LOPES, 2006).

Resumidamente, o aparelho *laser* consiste em uma cavidade, onde existirá um meio ativo podendo ser composto de substâncias gasosas, líquidas, ou sólidas, que quando seus átomos ou moléculas são excitados por uma fonte de energia externa, gerarão luz *laser*. Essa energia é absorvida pelos elétrons da

camada de valência do meio ativo, que saltam para um nível de energia mais elevado, portanto com nível de energia mais alto. Como os átomos não conseguem manter esse estado de excitação por um longo período, os elétrons voltam para suas órbitas iniciais, liberando uma forma de energia altamente concentrada que se chama fóton. Esse fóton estimula outros átomos que já estavam no estado excitado (emissão estimulada), desencadeando um processo em cascata, resultando na geração do feixe *laser* (BAGNATO, 2001; COSTA, 2002).

Essa cavidade do *laser* apresenta um ressonador que é composto por espelhos colocados nas paredes da cavidade de forma paralela, sendo que um dos espelhos reflete parcialmente a luz. Portanto, os fótons emitidos podem ser refletidos nessa cavidade estimulando outros átomos do meio ativo que também emitirão outros fótons, até atingir um estágio final de amplificação da radiação. O espelho que reflete parcialmente permite que um feixe de luz seja emitido, dando o comprimento de onda específico (monocromaticidade) (COTTON, 2004).

A luz *laser* tem características que a diferencia da luz de outras fontes luminosas, como a monocromaticidade, por ser composta de fótons de um comprimento de onda específico, sendo que a radiação emitida tem uma frequência única que determina a cor da luz se ela estiver no espectro visível. Porém, a radiação também pode estar na faixa do infravermelho ou ultravioleta, dependendo das características do material utilizado na sua fabricação. Outra propriedade da luz *laser* é a coerência, ou seja, todos os fótons seguem em uma única direção, movendo-se em fases no tempo e no espaço, sendo altamente ordenada e organizada. Finalmente, a luz *laser* possui colimação, ela é unidirecional, paralela ao seu eixo de geração e com convergência angular muito pequena, devido aos feixes de fótons serem colimados (polarizados, paralelos) (COSTA, 2002).

5.2 - Mecanismos da fotobioestimulação

Os mecanismos da estimulação da fototerapia nos tecidos são complexos e ainda não estão totalmente elucidados. Tiina Karu em 1988 foi a primeira a relatar os mecanismos de interação do *laser* com o tecido, a nível molecular. Ela sugeriu que componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias funcionavam como fotorreceptores primários da estimulação. A irradiação de luz transmitida via energia dos fótons para a célula é transformada em energia bioquímica, que será utilizada na cadeia respiratória mitocondrial. Em 1999, Karu discutiu que o citocromo c

oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) poderia ser o fotorreceptor primário da fotoestimulação e que esse mecanismo de ação difere entre os comprimentos de onda que se situam na região do visível e do infravermelho (IV) próximo (630-1000 nm). Nessa região, a fotobioestimulação ou fotobiomodulação, ativa a cadeia respiratória por meio da absorção da luz no citocromo c oxidase, aumentando a transferência de elétrons e metabolismo oxidativo da mitocôndria, o que aumenta a geração de espécies de oxigênio reativo, funcionando como moléculas sinalizadoras para promover a comunicação entre mitocôndria, citosol e núcleos. As reações primárias das moléculas fotorreceptoras levam às respostas fotobiológicas a nível celular através de cascatas das reações homeostáticas e bioquímicas, como a ativação dos genes de fatores de transcrição, gene de expressão de subunidade de citocromo oxidase, assim como outras enzimas e vias relacionadas com aumento do metabolismo oxidativo. Portanto, as células absorvem os fótons e os transforma em adenosina trifosfato (ATP), que será utilizado nos processos metabólicos, síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, enzimas, e outros produtos necessários para o reparo ou regeneração dos componentes celulares, acelerar mitoses ou proliferação celular e restaurar a homeostasia (KARU, 1999; KARU, 2003, WONG-RILEY et al., 2005; DESMET et al., 2006; KARU; PYATIBRAT, 2011; PRINDEZE et al., 2012).

Após as reações primárias ocorridas na mitocôndria, inicia-se uma cascata de sinalização celular (reação secundária) que parece ser regulada pelo estado redox intracelular (estado óxido-redutivo da célula). A célula é exposta a uma variedade de situações de estresse no ambiente extracelular e intracelular, havendo contínua exposição de espécie reativa de oxigênio (*ROS*). Esses *ROS* gerados por situações de estresse e fatores de crescimento, não são somente tóxicos para a célula, mas também são mensageiros secundários da sinalização de ativação e morte celular, e o estado de redox intracelular exerce função importante na regulação das vias fisiológicas de sinalização em muitas células (MATSUZAWA; ICHIJO, 2005; SEN; ROY, 2008). Acredita-se que a modulação do estado redox ativa os mecanismos de sinalização celular, através de fatores de transcrição e fosfolipases. Como regra, oxidantes estimulam os sistemas de sinalização celular e geralmente os redutores suprimem as cascatas sinalizadoras, resultando em supressão dos fatores de transcrição (KAMATA; HIRATA, 1999). Em 1988, Karu sugeriu que a ativação do metabolismo celular por luz visível monocromática é dada

por meio da regulação do redox celular. A irradiação é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória e as respostas biológicas dependem da dose, comprimento de onda e intensidade dessa irradiação.

A Figura 5 mostra a magnitude dos efeitos da fototerapia como dependente do estado redox inicial da célula. A principal idéia é que a resposta celular é fraca ou ausente quando o potencial redox da célula é ótimo ou próximo disso. Essa resposta celular é mais significativa quando o potencial redox da célula alvo é inicialmente deslocado para um estado mais reduzido (baixo pH intracelular) como em certas situações patológicas (diabetes, infecções ou desnutrição). Isso pode explicar porque os graus de resposta podem diferenciar entre os experimentos e porque algumas vezes essa resposta nem existe. Portanto, variações na magnitude dos efeitos da fototerapia (forte, fraco ou ausente) a nível celular são explicadas pelo estado redox (e pH intracelular) no momento da irradiação, sendo que células com o pH mais baixo (estado redox mais reduzido) respondem melhor à luz do que as células com pH normal (REDDY et al., 2001; KARU, 2003; PINHEIRO et al., 2004; LUBART et al., 2005; ALMEIDA-LOPES; LOPES, 2006; TAFUR; MILLS, 2008; PRINDEZE et al., 2012).

Figura 4: Esquema ilustrativo da ação principal da radiação monocromática visível e infravermelho próximo, na célula. A irradiação desloca o potencial redox celular na direção

mais oxidativa. A magnitude da resposta celular é determinada pelo potencial redox celular no momento da irradiação (KARU, 2003).

Além desse mecanismo fotoquímico, que está associado à absorção em nível mitocondrial (PASSARELA et al., 1984; KARU, 1988; GRECO et al., 1989; FRIEDMANN et al., 1991; VACCA et al., 1993; MANTEIFEL, et al., 1997; KARU 1999, KARU 2003, WONG-RILEY et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007), as células também absorvem a energia dos fótons por mecanismo foto-físico ao nível da membrana celular, aumentando a troca de íons entre a célula e o citoplasma (ROZENGURT; MENDOSA, 1980; POUYSSEGUR, 1985, LUBART et al., 1993; LUBART et al., 1996; LUBART et al., 1997). Em ambas as situações, a célula se beneficia da luz, aumentando sua atividade metabólica, que resulta em maior velocidade mitótica (MELLO; MELLO, 2001; PRINDEZE et al., 2012).

5.3 - Fototerapia na cicatrização de úlceras em modelos experimentais patológicos

Há mais de trinta anos, a fototerapia, por meio dos *lasers* de baixa potência, vem sendo amplamente utilizada como ferramenta terapêutica no processo de reparação tecidual cutâneo em várias áreas da saúde como medicina, fisioterapia, odontologia, entre outras. Vários estudos mostram os efeitos positivos da fototerapia em modelos *in vitro* (RAJARATNAM et al., 1994; GROSSMAN et al., 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER, 2003; KREISLER et al., 2003; HAWKINS et al., 2007), com animais (BAYAT et al., 2005; AL-WATBAN et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; YASUKAWA et al., 2007; SOUSA et al., 2011; DADPAY et al., 2012) e ensaios clínicos (LUCAS et al., 2003; CAETANO et al., 2008; SOBANKO et al., 2008; MINATEL et al., 2009), em todas as fases da cicatrização. Porém, os estudos de cicatrização de úlceras em modelo animal citados, foram realizados com animais saudáveis. Todavia, a eficácia da fotoestimulação pode ser curta, pois úlceras agudas geralmente cicatrizam bem, exceto quando sofrem alguma intervenção, como em certas condições patológicas, como por exemplo, diabetes, processos infecciosos, desnutrição, obesidade, síndrome metabólica. As condições para avaliação da eficácia da fototerapia estão sendo exploradas usando modelo animal de úlceras com algum processo patológico (REDDY, 2001), porém, poucos estudos têm avaliado a eficácia terapêutica desses

modelos patológicos (REDDY et al., 2001; PINHEIRO et al., 2004; AL-WATBAN et al., 2007; WEINGARTEN et al., 2008; NOUDEH et al., 2010; KAVIANI et al., 2011). Recentemente, alguns autores têm investigado a relação dos efeitos da fototerapia com o ambiente de estresse oxidativo em modelos de animais saudáveis (SILVEIRA et al., 2011) e outros com processos patológicos, principalmente diabetes melitus (FIRAT et al., 2013). Porém, são necessários mais estudos e novos modelos patológicos para elucidar os mecanismos de interação da fototerapia e estresse oxidativo.

5.3.1 - Fototerapia em modelos patológicos *in vitro*

Almeida-Lopes et al., (2001) aplicou a fototerapia (*laser* diodo) em diferentes comprimentos de onda (670 nm, 692 nm, 780 nm, 786 nm), porém com a mesma fluência de 2 J/cm^2 , em cultura de fibroblastos em dois meios de cultivo celular, meio ideal para proliferação celular (10% de soro bovino fetal) e meio com situação de estresse, apresentando déficit nutricional (5% de soro bovino fetal). Os resultados mostraram que as células em meio com déficit nutricional, apresentaram crescimento celular significativamente menor que as células no meio ideal de crescimento. No entanto, quando irradiadas, as células em meio com deficiência nutricional apresentaram crescimento similar ou maior que as células cultivadas em condições ideais para o crescimento.

Libanore (2008) avaliou a taxa de crescimento em cultura de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* após irradiação com *laser* de diodo em dois comprimentos de onda (685 nm e 830 nm) separadamente e em associação, nas doses de 1, 2 e 4J (fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm^2 respectivamente). Os resultados mostraram maior inibição do crescimento bacteriano com a dose e densidade de energia mais alta (4J e fluência de 133,33 J/cm^2). O comprimento de onda de 685 nm com dose de 4J, apresentou maior taxa de inibição para a bactéria *S. aureus*, e os comprimentos de onda de 685 e 830 nm com dose de 2 e 4J apresentaram maior inibição no crescimento da bactéria *P. aeruginosa*.

Aiuk et al., (2012) avaliaram os efeitos da laserterapia em modelos *in vitro* de fibroblastos de pele humana extraído de úlceras diabéticas e não diabéticas. As células foram irradiadas por *laser* diodo no comprimento de onda de 660 nm e fluência de 5 J/cm^2 . Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C por 48 ou 72

horas. Os resultados mostraram que os fibroblastos retirados de úlceras diabéticas apresentaram aumento na proliferação, viabilidade e migração celular e conteúdo de colágeno em comparação aos fibroblastos retirados das úlceras não diabéticas.

5.3.2 - Fototerapia em modelos patológicos *in vivo*

Existem poucos estudos relatando os efeitos da fototerapia na cicatrização cutânea em modelos patológicos utilizando animais, sendo que o mais estudado é de diabetes melitus (AL-WATBAN et al., 2007; WEINGARTEN et al., 2008; NOUDEH et al., 2010). Contudo, raros trabalhos avaliaram marcadores do estresse oxidativo tecidual para relacionar a influência do laser na cicatrização de úlceras em condições normais e patológicas.

Silveira et al., 2011 avaliaram os efeitos da fototerapia na cicatrização cutânea em ratos normais e a influência do estresse oxidativo. As úlceras foram tratadas por laser HeNe (660 nm) e GaAs (904 nm) nas doses de 1 ou 3 J/cm² nos tempos de 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós cirurgia. Os resultados mostraram que as úlceras irradiadas (HeNe 1 e 3 J/cm² e GaAs 3 J/cm²) apresentaram melhora no processo cicatricial pela diminuição das áreas ulceradas e aumento no conteúdo de colágeno, e diminuição nos marcadores de estresse oxidativo (TBARS e enzimas antioxidantes como, superóxido dismutase e catalase) em comparação com as úlceras controle.

Firat et al., 2013 avaliaram os efeitos da fototerapia na cicatrização cutânea de ratos diabéticos e a relação com o estresse oxidativo. O tratamento fototerápico foi realizado por meio do laser GaAlAs na dose de 10 J/cm² logo após a cirurgia e posteriormente no 2º, 4º e 6º dias pós-operatório. Os resultados histopatológicos evidenciaram que as úlceras diabéticas irradiadas apresentaram diminuição no número de células inflamatórias e aumento da atividade mitótica dos fibroblastos, da síntese de colágeno e vascularização comparada as úlceras diabéticas controle. Adicionalmente, as úlceras irradiadas mostraram diminuição no estado oxidativo total e, portanto, modulação do estresse oxidativo tecidual.

5.3.3 – Fototerapia em modelos humanos associado a condições patológicas

Minatel et al., 2009 realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo, com 23 pacientes diabéticos que foram tratadas com fototerapia (LEDs 660/890 nm, 3 J/cm²) ou placebo, duas vezes por semana durante 3 meses. Em todos os tempos avaliados, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias as úlceras irradiadas apresentaram aumento nos índices de cicatrização e nas médias de tecido de granulação em comparação com o placebo. Os autores concluíram que a fototerapia estimulou o tecido de granulação e acelerou o processo cicatricial em úlceras diabéticas crônicas.

Em outro estudo, Kaviani et al., 2011 realizaram um estudo clínico randomizado, duplo cego com 23 pacientes diabéticos apresentando mal perfurante plantar. As úlceras plantares foram tratadas com fototerapia (laser 685 nm, 10 J/cm²) em adição ao tratamento convencional ou tratamento placebo, diariamente durante 20 semanas. Os resultados mostraram na 4ª semana de tratamento que as úlceras plantares irradiadas apresentaram diminuição significativa nas áreas ulceradas em comparação com as úlceras controle. Além disso, após 20 semanas, a média do tempo de cicatrização completa nas úlceras irradiadas foi menor em relação ao controle mostrando evidências que a fototerapia pode acelerar o processo cicatricial de úlceras plantares em pacientes diabéticos.

Os estudos citados avaliaram os efeitos da fototerapia na cicatrização cutânea em ensaios clínicos, porém, não foram encontrados estudos que avaliaram marcadores do estresse oxidativo nestas condições.

Justificativa

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial torna-se rotineiro o atendimento de pacientes idosos apresentando lesões ulceradas de múltiplas etiologias como úlceras venosas, arteriais, diabéticas além das úlceras de pressão devido ao repouso prolongado conseqüente das doenças degenerativas.

Somam-se a esses, pacientes mais jovens diabéticos com mal perfurante plantar, além de adultos jovens que apresentam distúrbios metabólicos e sofrem procedimentos cirúrgicos ou traumas, ficando susceptíveis a desenvolver úlceras crônicas.

Essas úlceras, associadas às alterações metabólicas como, hipercolesterolemia, resistência à insulina, *diabetes mellitus*, obesidade, síndrome metabólica entre outras, têm seu processo de cicatrização alterado, prolongando o tempo de reparo, agravando o quadro clínico do paciente e aumentando os custos para o sistema de saúde.

Atualmente, da mesma forma que vem aumentando a freqüência das lesões ulceradas, também aumentaram as alternativas terapêuticas no mercado. No entanto, essas são de alto custo e poucas aceleram o processo de cicatrização além do normal. A fisioterapia, como parte integrante de um contexto multidisciplinar, oferece a fototerapia como ferramenta terapêutica adjuvante no tratamento de úlceras cutâneas.

A fototerapia vem sendo utilizada através dos anos, no processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em modelos experimentais e estudos clínicos em humanos. Na literatura encontram-se vários modelos animais para o estudo da cicatrização de úlceras em seu processo normal, porém são raros os modelos animais que reproduzem esse processo de cicatrização em condições patológicas (diabetes, obesidade, síndrome metabólica). Estudos recentes têm relacionado efeitos positivos da fototerapia na reparação tecidual em ambiente de estresse oxidativo causado por condições sistêmicas associadas (PRINDEZE et al., 2012; FIRAT et al, 2013).

Por isso torna-se relevante estudar o processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em um modelo animal submetido à dieta hiperlipídica, com a finalidade de ampliar os conhecimentos sobre a cicatrização das úlceras e a influência de alterações metabólicas no processo de reparo. Além disso, estudar os efeitos da fototerapia na cicatrização de úlceras em condições de estresse oxidativo

experimental, para entender melhor essa interação entre cicatrização, estresse oxidativo e fotoestimulação.

Objetivos

Geral:

Avaliar os efeitos da fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos submetidos a dieta controle e hiperlipídica.

Específicos:

- Avaliar os efeitos sistêmicos das dietas em ratos normolipídicos e hiperlipídicos;
- Avaliar as diferenças na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos normolipídicos e hiperlipídicos;
- Avaliar o estresse oxidativo no fragmento de pele durante o processo de cicatrização cutânea nos ratos normolipídicos e hiperlipídicos;
- Avaliar a cicatrização das úlceras cutâneas em ratos normolipídicos e hiperlipídicos tratados pelo laser diodo 660 nm;
- Avaliar o estresse oxidativo no fragmento de pele durante o processo de cicatrização cutânea em ratos normolipídicos e hiperlipídicos tratados pelo laser diodo 660 nm;

Animais e Métodos

1 – Seleção dos animais

Foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, com cerca de 2 meses de idade, pesando em média 200 gramas (g) oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, onde os animais ficaram alojados em gaiolas individuais de polietileno com tampa de aço inoxidável. O ambiente foi mantido em temperatura constante de 22° C, com umidade relativa do ar em torno de 60% e com exaustão de ar automática. Luz artificial em um ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas (6h-18h). Os animais receberam água *ad libitum*. Esse projeto está de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, processo 205/2011 (vide Anexo A).

1.2 – Padronização das dietas controle e experimental

O modelo experimental foi baseado em dieta hiperlipídica para indução de esteatose hepática padronizado por Leonardi et al. (2010). Os ratos foram pesados no dia de chegada ao biotério e divididos aleatoriamente em dois grupos de 40 animais cada. Um grupo recebeu dieta controle (AIN-93) e o outro grupo recebeu dieta hiperlipídica com 50% de gordura saturada (Tabela 1). A gordura saturada utilizada foi banha de origem animal, e antes de ser adicionada à dieta, foi aquecida e derretida à 180°C no intuito de melhorar a palatabilidade dos animais. Esse procedimento foi realizado durante 45 dias para indução de estresse oxidativo experimental.

Tabela 1: Composição nutricional das dietas controle e experimental

NUTRIENTES	DIETAS EXPERIMENTAIS (g/1000g de ração)	
	NORMOLIPÍDICOS	HIPERLIPÍDICOS
Proteína (caseína)	200	200
Lipídeo (banha animal)	70	500
Carboidrato (amido de milho)	532,5	202,5
Fibra (celulose)	50	50
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
Colina	2,5	2,5

1.3 – Confirmação do estado nutricional

1.3.1 – Massa corporal

Para a confirmação do estado nutricional foi realizado o acompanhamento da massa corporal dos animais sendo pesados em balança digital calibrada no dia que chegaram ao biotério e no dia do procedimento cirúrgico.

1.3.2 – Dosagem dos níveis glicêmicos

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, 60 animais (30 de cada grupo) ficaram em jejum de 8 horas e posteriormente, uma amostra de sangue da cauda dos animais foi coletada para análise da glicemia usando o glicosímetro Optium™ Xceed™ (MediSense® - Victoria, AU, EUA).

1.3.3 – Perfil lipídico dos animais

O perfil lipídico foi realizado a partir do sangue coletado dos animais sacrificados no 2º dia pós-operatório. O fato de utilizar dosagens do 2º PO justifica-se em evitar o sacrifício de muitos animais antes de iniciar o experimento somente para retirada de sangue e realização das dosagens.

Foi coletado sangue de 10 animais normolipídicos e 10 animais hiperlipídicos e para dosagens de HDL, colesterol total e triglicérides. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Nutrição da FMRP-USP.

1.3.4 – Determinação dos níveis plasmáticos de adiponectina

Os níveis séricos de adiponectina (AdipoGen®, Seoul Korea) foram avaliados utilizando kits de ELISA específicos, de acordo com as especificações do fabricante. Foi coletado sangue de 10 animais normolipídicos e 10 animais hiperlipídicos para as dosagens, as quais foram realizadas no Laboratório de Nutrição da FMRP-USP.

1.3.5 – Avaliação hepática

Os animais sacrificados no 2º dia pós-operatório foram dissecados e coletados os fígados, sendo os mesmos fotografados e armazenados para posterior análise histológica. Esses procedimentos foram realizados para avaliar clínica e histologicamente presença ou não de esteatose hepática nos animais.

1.4 – Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados novamente e posteriormente receberam anestesia geral intraperitoneal (tribromoetanol – 2,5%, 100 µl/10g do animal), e em seguida foi realizada a tricotomia no dorso dos ratos. Logo após, foram feitas duas úlceras no dorso de cada animal usando um *punch* de 15 mm de diâmetro e posteriormente lavadas com soro fisiológico 0,9%. Após a cirurgia, foi aplicada por via intraperitoneal dose única de DIPIRONA (Medley S/A – Campinas, SP, Brasil) 50 mg/Kg de peso do animal diluída em salina.

1.5 – Aparelho de fototerapia

Para a aplicação da fototerapia foi utilizado o equipamento, devidamente calibrado (Anexo B), *Flash Lase III* (DMC Equipamentos – São Carlos, SP, Brasil) laser de semicondutor sólido de AsGa no comprimento de onda de 660 nanômetros (nm) e potência de 100 *miliWatts* (mW) (Figura 5).

Figura 5: Aparelho *Flash Lase III*

1.6 – Padronização dos grupos

Os animais foram então divididos em 4 grupos de 20 animais cada, sendo dois grupos de animais que receberam dieta Normolipídica (**NL**), e dois grupos de animais que receberam dieta Hiperlipídica (**HL**), a saber:

Normolipídico laser negativo: (NLL–): os animais receberam dieta normolipídica e foram submetidos à fototerapia com o aparelho desligado.

Normolipídico laser positivo: (NLL+): os animais receberam dieta normolipídica e foram submetidos à fototerapia na dose de 2J.

Hiperlipídico laser negativo: (HLL-): os animais receberam dieta hiperlipídica e foram submetidos à fototerapia com o aparelho desligado.

Hiperlipídico laser positivo: (HLL+): os animais receberam dieta hiperlipídica e foram submetidos à fototerapia na dose de 2J.

1.7 – Padronização do procedimento da fototerapia

A fototerapia foi aplicada de modo estacionário, um ponto por sessão, em contato com a úlcera, a qual estava protegida por filme plástico tipo PVC, sendo a primeira aplicação imediatamente após o procedimento cirúrgico e depois as irradiações foram feitas três vezes por semana, durante 14 dias, totalizando 7 sessões de tratamento. O tratamento foi realizado por meio de laser diodo, diâmetro da sonda de aplicação 0,06 cm², comprimento de onda de 660 nm, potência de saída de 100 mW, tempo de tratamento de 20 segundos por sessão, dose de 2 J, fluência de 70 J/cm² e dose acumulada de 14 J por úlcera de cada animal. As especificações descritas estão de acordo com a Associação Mundial de Laserterapia (WALT, 2004).

1.8 – Eutanásia e dias de seguimento das avaliações

Os animais foram sacrificados por meio de decapitação nos dias 2, 7, e 14 após o procedimento cirúrgico (n=6 animais/tempo/tratamento). As úlceras foram fotografadas para análise da reepitelização.

1.9 – Captura e análise de imagens

As úlceras foram fotografadas nos dias 0, 2°, 7° e 14° dia pós-operatórios por câmera Digital Sony P41 no tamanho de 4 megapixels, sem *flash* e sem *zoom*, que foi fixada em um aparelho padronizado para captura de imagens, apresentando uma régua milimetrada com referência de medida, confeccionado na Oficina de Precisão da FMRP-USP (Figura 6).

Figura 6: **(A)**. Suporte padronizado para captura de imagens. **(B)**. Posicionamento do animal para a captura de imagens das úlceras cutâneas dorsais.

Posteriormente, as imagens foram transferidas ao computador e as áreas das úlceras foram analisadas pelo programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que é um processador e analisador de imagens em JAVA de domínio público inspirado no *NIH Image* da *Apple Macintosh*. Dessa forma executa em diversos tipos de máquinas e ambientes desde que os mesmos possuam uma máquina virtual Java apropriada. O ImageJ vêm sendo utilizado como ferramenta alternativa para resolver tarefas comuns de análise de imagens microscópicas e ultraestruturais. Ele não é somente um programa de análise morfométrica, mas também adaptável a diversas tarefas na rotina laboratorial, como mensuração de áreas teciduais, contagem de células, quantificação imunohistoquímica da expressão de anticorpos e contagem de partículas em microscopia imunoelétrica (PAPADOPULOS et al., 2007; NOURSADEGHI et al., 2007; CAETANO et al., 2008; SIEUWERTS et al., 2008; HEWIT; RESTINGER, 2008; MINATEL et al., 2009; ANDRADE et al., 2011; LEITE et al., 2011).

1.10 – Avaliação da cicatrização das úlceras

A documentação fotográfica das úlceras dos quatro grupos, nos dias 0, 2º, 7º e 14º pós-operatórios (12 úlceras/tempo/tratamento) foi analisada pelo programa ImageJ pelo procedimento a seguir:

- Após a abertura da imagem no programa ImageJ foi realizada a padronização da medida em mm no plugin *Analyse/Set Scale*, o polígono foi selecionado para a execução do delineamento manual com o mouse nas bordas da úlcera. A seleção da borda delineada foi salva com a extensão *ROI*. Após esse

procedimento, ao clicar <CTRL+M> o software calcula automaticamente a área da úlcera em mm² (Figura 7).

Figura 7: Esquema ilustrativo da análise das áreas das úlceras através do programa ImageJ (A) Delimitação da área da úlcera (B) Colocação da escala (C) Resultado da área em milímetros

Whelan et al., (2001) e Wellenstein et al., (2004) utilizaram medidas de percentuais de cicatrização de úlceras. Já Rocha-Jr. et al., (2006) utilizou a média dos diâmetros das úlceras para avaliar a reepitelização. Dessa forma, foi utilizado o Índice de cicatrização das úlceras (ICU's), medidas de forma normalizada, calculadas no 2º, 7º e 14º dias pós-operatório, conforme a equação abaixo, onde ICU = Índice de Cicatrização de Úlceras; Ai = área inicial; Af = área final.

$$ICU = \frac{Ai - Af}{Ai}$$

O ICU representa o resultado da diferença entre a área inicial (tempo 0) e área final (tempo f) dividido pela área inicial tendo como base a reepitelização quando completa $ICU = 1$ enquanto $ICU = 0$ demonstra área sem sinais de reepitelização, $ICU > 0$ quando houver redução na área ulcerada, e $ICU < 0$ quando houver aumento na área ulcerada (CAETANO et al., 2008; MINATEL et al., 2009; ANDRADE et al., 2011).

1.11 – Coleta do material para estudo

Os animais tiveram toda a pele dorsal avulsionada e por meio de *punch* histológico de 15 mm de diâmetro foi coletada uma biópsia cilíndrica de cada uma das duas úlceras/cicatrizes, as quais foram utilizadas para as seguintes finalidades:

✓ **Estudos histopatológicos:** Foi utilizada uma das úlceras de cada 6 animais ($n=6$ amostras) de cada tempo e tratamento para serem acondicionadas em solução de formaldeído 3,7% tamponada para estudos histopatológicos (coloração com hematoxilina e eosina) qualitativos avaliando aspectos da cicatrização como, necrose, infiltrado inflamatório, fibroplasia e organização do colágeno.

✓ **Estudos bioquímicos:** A outra úlcera de cada um desses 6 animais de cada tempo e tratamento, foi seccionada e cada fragmento foi destinado à realização dos diferentes estudos bioquímicos (hidroxiprolina e estudos do estresse celular). Os fragmentos foram pesados, acondicionadas em eppendorf's distintos com tampão específico e permaneceram no freezer à -80°C até as respectivas dosagens.

1.12 – Estudo do estresse celular e defesas antioxidantes

As dosagens de MPO, MDA, FOX, GSH e proteínas totais foram realizadas em macerados de pele (6 animais/tempo/tratamento) em colaboração e supervisão com o Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior no Laboratório de Nutrição, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrição e Metabolismo – FMRP-USP, juntamente com a técnica MSc. Paula Payão Ovidio.

1.12.1 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

As biópsias (6 animais/tempo/tratamento) foram acondicionadas em eppendorf's de 2,0 mL com 200 µL de tampão NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02M, NaEDTA 0,015M pH 4,7 (tampão 1) gelado e permaneceram no freezer -80°C até a dosagem. Os fragmentos foram homogeneizados pelo Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA, EUA) a 13.000 rpm. Após centrifugação foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (tampão 2). Em seguida, 5,0 µL do sobrenadante das amostras foram colocadas em placa de 96 poços para o ensaio. Foi feita uma curva padrão de neutrófilos obtidos na cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina. Em cada poço da placa foram adicionados 25 µL de TMB – “3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine” (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) e em seguida 100 µL de H₂O₂. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M e lida em leitor de placas à 450 nm (MORENO et al., 2006). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos x 10³/mg tecido.

1.12.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-“Thiobarbituric Acid Reactive Substances”)

A peroxidação lipídica do homogenato da pele foi quantificada pela TBARS e determinadas por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados cujo principal representante é o malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre o aquecimento por 30 minutos a 100°C em banho-maria (FANEM - Guarulhos, SP, Brasil). Esta reação produz um composto de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro (UV-Vis Modelo Q98U Quimis - Diadema, SP, Brasil) no comprimento de onda 535 nm (BUEGE, AUST, 1978).

Para quantificar o MDA ligado a macromoléculas, as amostras de homogenato foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por (CIGHETTI et al., 1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 100 mg de pele foram homogeneizados com 1,0 mL de KCl 1,15% com o auxílio do homogeneizador Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA EUA). Em

seguida adicionou-se 3 mL de água pura (Milli-Q, Milipore – Bedford, MA, EUA) e 0,5 mL de NaOH 2M. Após agitação em vortex (PHOENIX - Araraquara, SP, Brasil), os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos em banho-maria e, então neutralizados com HCl 2M para seguirem a reação com o ácido tiobarbitúrico. Os resultados são expressos por nmol MDA/g tecido.

1.12.3 – Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)

Os hidroperóxidos foram determinados pelo método da oxidação dos íons férricos na presença de xilenol laranja, em que 1 mL de solução de 100 mM de xilenol laranja, 4 mM BHT (hidroxitolueno butilado), 25 mM de ácido sulfúrico e 250 mM de sulfato ferroso em metanol: água (9:1 v/v) foi adicionada a uma alíquota de 100 µL do homogenato da biópsia. Após, agitar e encubar por 30 minutos em temperatura ambiente, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida a 560 nm e comparada com a curva padrão de peróxido de hidrogênio em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂/g tecido.

1.12.4 – Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

A quantificação da GSH foi realizada por método colorimétrico que consistiu na reação do grupo sulfidril com 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm. A concentração foi calculada utilizando-se a curva padrão de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Os resultados foram expressos em µmol GSH/g tecido.

1.12.5 – Determinação das proteínas totais

As dosagens de proteínas totais no homogenato de tecido foram realizadas por meio de kit comercial utilizando o método de Biureto (Labtest Diagnóstica - Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em g proteínas totais/g tecido.

1.13 – Dosagem de hidroxiprolina

As biópsias (6 animais/tempo/tratamento) foram acondicionadas em eppendorf's de 2 mL em nitrogênio líquido e liofilizadas. O liofilizado foi homogeneizado em POLYTRON com água destilada. Foi incluída a solução ácida de colágeno purificada (dissolvida em 50 mM de buffer acetato pH 3,5) como um teste para estimar a hidroxiprolina.

Alíquotas do padrão de hidroxiprolina (2-20µg) e da amostra teste foram hidrolisadas em solução alcalina (NaOH concentração final de 2N em volume total de 50 µL). A hidrólise ocorreu em autoclave à 120°C por 120 minutos. No hidrolisado foi adicionado 450 µL de cloramina T e a oxidação ocorreu em temperatura ambiente por 25 minutos. A cor foi desenvolvida com a incubação de 500 µL de reagente de Ehrlich à 65°C por 20 minutos. Em seguida a absorbância de cada amostra foi medida por espectrofotômetro em 550 nm. Os valores de absorbância foram plotados contra a concentração padrão de hidroxiprolina, e a presença de hidroxiprolina no estrato tecidual desconhecido (amostra) foi determinado a partir da curva padrão (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Os resultados foram expressos µg de hidroxiprolina/mL/mg de tecido.

1.14 – Análise estatística

A medida da massa corporal, os valores das dosagens séricas, análise da colagênese, ICUs, e marcadores do estresse oxidativo nos animais normolipídicos e hiperlipídicos nos dias 2, 7 e 14 de seguimento foram analisados pelo teste *t student* para comparação entre duas amostras não paramétricas. Os ICU's, a colagênese, e marcadores do estresse oxidativo dos 4 grupos no 2º, 7º e 14º dia pós-operatório foram analisados pelo teste ANOVA para análise de variância dos grupos e teste de Bonferroni para comparação entre múltiplas amostras, considerando que os valores de $p < 0,05$ mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão.

Resultados

1 – Resultados do artigo intitulado: ‘Influência do estresse oxidativo experimental na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos’

1.1 – Confirmação do modelo experimental

Embora não tenha havido diferença quanto à massa corporal dos animais após 45 dias de dieta hiperlipídica foram observadas maiores dosagens séricas de glicose ($p=0,0001$), colesterol total ($p=0,0002$), triglicérides ($p=0,0001$) e menores níveis de adiponectina (APN) ($p=0,003$) quando comparadas as dosagens do grupo de dieta normolipídica demonstrada nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Além disso, foram realizadas fotos dos fígados dos animais sacrificados no 14º dia, mostrando que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram fígados de coloração esbranquiçada com focos de necrose e fibrose, representando quadro avançado de esteatose hepática. (Figura14 a,b). Corroborando com os resultados macroscópicos, a análise histológica em HE de forma qualitativa mostrou acúmulos de gordura nos hepatócitos, além de nichos de células inflamatórias, sugerindo quadro de esteatose hepática (Figura 15 a,b).

Figura 8: Massa corporal (g) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 9: Valores da glicemia (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 10: Valores do colesterol total (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 11: Valores de triglicerídeos (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 12: Valores de HDL (mg/dL) dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 13: Valores de adiponectina dos ratos dos grupos normolipídico e hiperlipídico após 45 dias de seguimento

Figura 14: Aspecto clínico do fígado dos ratos mantidos sob dieta normolipídica (A) e sob dieta hiperlipídica (B).

Figura 15: Micrografia do tecido hepático dos ratos mantidos sob dieta normolipídica **(A)** e sob dieta hiperlipídica **(B)**. (coloração HE, aumento 100x).

1.2 – Estudo histopatológico da cicatrização

Em relação a análise histopatológica qualitativa, no 2º dia de seguimento as úlceras do grupo NL apresentaram grande quantidade de tecido necrótico (crosta), com leve processo inflamatório representado principalmente por neutrófilos (Figura 16 A). Já as úlceras do grupo HL também apresentaram grande quantidade de necrose porém, com intenso infiltrado inflamatório e grande quantidade de neutrófilos (Figura 16 B). Em relação ao 7º dia as úlceras do grupo NL apresentaram pequena quantidade de necrose e moderado infiltrado inflamatório (Figura 17 A). As lesões do grupo HL ainda apresentaram grande quantidade de necrose e moderado infiltrado inflamatório (Figura 17 B). No 14º dia de seguimento o grupo NL apresentou discreto infiltrado inflamatório, número moderado de fibroblastos, pequena organização do colágeno e epiderme neoformada (Figura 18 A). Já o grupo HL ainda apresentou moderada quantidade de necrose, pequeno infiltrado inflamatório, pequena quantidade de fibroblastos com colágeno desorganizado e epiderme em formação (Figura 18 B).

Figura 16: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos **(A)** e hiperlipídicos **(B)** no 2º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

Figura 17: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos **(A)** e hiperlipídicos **(B)** no 7º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

Figura 18: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos normolipídicos **(A)** e hiperlipídicos **(B)** no 14º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

1.3 – Evolução do processo de reepitelização

Embora não tenha havido diferença quanto ao estudo da reepitelização das úlceras cutâneas nos dias 2 e 7 de seguimento, no 14º dia o grupo NL apresentou maiores ICUs ($p=0,0001$) em relação ao grupo HL (Figura 19).

Figura 19: Índice de cicatrização das úlceras (ICUs) dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento.

1.4 – Indução da colagênese

No 14º dia de seguimento o grupo NL ($p=0,0001$) apresentou maior concentração de hidroxiprolina em relação ao HL demonstradas na Figura 20.

Figura 20: Dosagens de hidroxiprolina dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento.

1.5 – Estresse oxidativo

Quanto aos níveis de MPO, no 2º dia de seguimento o grupo HL apresentou níveis mais elevados em relação ao grupo NL (Figura 21). Em relação ao MDA, o grupo HL apresentou aumento nos níveis em relação ao grupo NL ($p=0,0003$) fato que ocorreu também no 14º dia ($p=0,0001$) (Figura 22). Os resultados da determinação de peróxidos de hidrogênio pelo método FOX foram semelhantes ao MDA. No 2º e 14º dia o grupo HL apresentou aumento nos níveis de H_2O_2 em relação ao grupo NL respectivamente ($p=0,01$) (Figura 23).

Figura 21: Dosagens de MPO dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento

Figura 22: Dosagens de MDA dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento

Figura 23: Dosagens de FOX dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento

1.6 – Defesas antioxidantes

No 2º dia de seguimento o grupo HL apresentou aumento nos níveis de GSH em relação ao grupo NL ($p=0,009$) (Figura 24).

Figura 24: Dosagens de GSH dos grupos normolipídicos e hiperlipídicos avaliados no 2º, 7º e 14º dia acompanhamento

2 – Resultados do artigo intitulado: ‘Fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo experimental’

2.1 – Estudo histopatológico da cicatrização

No 2º dia de seguimento todos os grupos apresentaram formação de grande quantidade de tecido necrótico (crosta). O grupo NLL- apresentou leve processo inflamatório representado principalmente por neutrófilos (Figura 25 A) enquanto o grupo NLL+ apresentou moderado infiltrado inflamatório (Figura 25 B). Já as úlceras do grupo HLL- mostraram intenso infiltrado inflamatório e grande quantidade de neutrófilos (Figura 25 C) enquanto o HLL+ apresentou leve infiltrado inflamatório (Figura 25 D). No 7º dia, as úlceras do grupo NLL- apresentaram pequena quantidade de necrose, moderado infiltrado inflamatório, poucos fibroblastos e colágeno desorganizado (Figura 26 A) enquanto o NLL+ apresentou pequena quantidade de necrose, moderado infiltrado inflamatório, poucos fibroblastos, colágeno mais organizado em relação ao NLL- (Figura 26 B). As lesões do grupo HLL- ainda apresentaram grande quantidade de necrose, moderado

infiltrado inflamatório, poucos fibroblastos e colágeno desorganizado (Figura 26 C), já o grupo HLL+ apresentou leve infiltrado inflamatório, moderada quantidade de fibroblastos, colágeno mais organizado em relação aos demais grupos e formação de nova epiderme (Figura 26 D). No 14º dia, o grupo NLL- algumas células inflamatórias, número moderado de fibroblastos, colágeno pouco organizado, e epiderme neoformada (Figura 27 A), já o grupo NLL+ apresentou poucas células inflamatórias, moderado número de fibroblastos, colágeno mais organizado e formação da epiderme (Figura 27 B). Já o grupo HLL- ainda apresentou moderada quantidade de necrose, pequeno infiltrado inflamatório, pequena quantidade de fibroblastos com colágeno desorganizado e epiderme em formação (Figura 27 C); o grupo HLL+ apresentou grande quantidade de fibroblastos, colágeno mais organizado em relação ao NLL+ e formação de epiderme (Figura 27 D).

Figura 25: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- **(A)**, NLL+ **(B)**, HLL- **(C)** e HLL+ **(D)** no 2º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

Figura 26: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- **(A)**, NLL+ **(B)**, HLL- **(C)** e HLL+ **(D)** no 7º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

Figura 27: Micrografia do tecido cutâneo dos ratos dos grupos NLL- **(A)**, NLL+ **(B)**, HLL- **(C)** e HLL+ **(D)** no 14º dia de seguimento (coloração HE, aumento de 200x)

2.2 – Estudo da reepitelização

No 2º dia de acompanhamento, as úlceras do grupo NLL+ apresentaram maiores ICUs em comparação com HLL- ($p<0,05$). Já o grupo HLL+ apresentou maiores ICU's em relação aos demais grupos, diferente dos grupos controles, NLL- e HLL- ($p<0,05$). No 14º dia, as úlceras do grupo NLL+ continuaram apresentando maiores ICUs em relação ao HLL- ($p<0,05$) e o grupo HLL+ apresentou maiores índices em comparação com os grupos HLL- e NLL+ ($p<0,05$). Entre os controles, o HLL- apresentou menores ICUs em relação ao NLL- ($p<0,05$) (Figura 28).

Figura 28: Índices de cicatrização das úlceras (ICUs) dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dia de acompanhamento. * $p<0,05$

2.3 – Indução da colagênese

No 7º dia de seguimento o grupo NLL+ apresentou aumento no conteúdo de hidroxiprolina em relação aos demais grupos ($p<0,05$). No 14º dia o grupo NLL+ continuou apresentando maior concentração de hidroxiprolina frente aos demais grupos ($p<0,05$), e o grupo HLL+ apresentou maior concentração de hidroxiprolina em relação ao grupo HLL- ($p<0,05$). Entre os grupos controles, o HLL- apresentou menores índices em comparação com o grupo NLL- ($p<0,05$). (Figura 29).

Figura 29: Avaliação dos níveis de hidroxiprolina nos grupos avaliados nos dias avaliados. * $p < 0,05$

2.4 – Estudo do estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Em relação as dosagens de MPO, no 2º dia de seguimento o grupo NLL+ apresentou aumento nos níveis de MPO em relação aos grupos NLL- e HLL+ ($p < 0,05$). No 7º dia, o grupo NLL+ apresentou diminuição nos níveis em comparação com o grupo NLL- ($p < 0,05$) e o grupo HLL+ apresentou menores níveis de MPO em relação aos grupos controles NLL- e HLL- ($p < 0,05$). (Figura 30).

Figura 30: Dosagens de MPO na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento

Quanto à dosagem de MDA na pele, no 2º dia de seguimento o grupo HLL+ apresentou níveis mais baixos em relação ao grupo HLL- ($p<0,05$). Entre os grupos controles, o grupo HLL- apresentou níveis elevados de MDA em comparação ao grupo NLL- ($p<0,05$). No 14º dia o grupo NLL+ apresentou níveis mais baixos em relação ao grupo HLL- ($p<0,05$). Entre os controles, o grupo HLL- continuou apresentando níveis elevados de MDA em comparação ao grupo NLL- ($p<0,05$) (Figura 31).

Figura 31: Dosagens de MDA na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento. * $p<0,05$

Em relação às dosagens de peróxidos de hidrogênio por meio do método FOX na pele, no 2º dia de acompanhamento o grupo NLL+ apresentou níveis elevados diferente significativamente dos grupos NLL- e HLL+ ($p<0,05$). Já o grupo HLL+ apresentou níveis baixos de FOX diferente estatisticamente do HLL- e NLL+ ($p<0,05$) (Figura 32). Nos outros dias de seguimento não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados.

Figura 32: Dosagens de FOX na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento. * $p < 0,05$

As dosagens de GSH na pele no 7º dia de acompanhamento mostraram níveis mais elevados no grupo HLL+ em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). No 14º dia o grupo HLL+ apresentou níveis mais baixos em relação aos demais grupos porém, sem diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 33).

Figura 33: Dosagens de GSH na pele dos animais dos grupos avaliados no 2º, 7º e 14º dias de seguimento. * $p < 0,05$

Discussão

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial e o consequente incremento da população idosa tornou-se rotineiro o atendimento de pacientes idosos apresentando lesões ulceradas de múltiplas etiologias como úlceras venosas, arteriais, diabéticas, entre outras. Além disso, adultos jovens que apresentam distúrbios metabólicos e sofrem procedimentos cirúrgicos ou traumas, são susceptíveis a desenvolver úlceras crônicas (WILSON; CLARK, 2004). Essas úlceras, associadas às condições de alterações metabólicas como, aumento da massa corporal, hiperglicemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina, entre outras, têm seu processo de cicatrização alterado, prolongando o tempo de reparo, agravando o quadro clínico do paciente e aumentando os custos para o sistema de saúde. Estima-se que cerca de seis milhões de pessoas no mundo sofram de desordens na cicatrização de úlceras (RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011).

O processo de cicatrização de úlceras cutâneas é um processo complexo, dinâmico, que envolve interação de vários tipos celulares, componentes da matriz e diversas citocinas e fatores de crescimento com o objetivo de restaurar a integridade mecânica e função barreira da pele (SCHULTZ et al., 2011). Vários fatores locais ou sistêmicos podem prejudicar a cicatrização e contribuir para cronicidade das úlceras. Ingestão de dietas hiperlipídicas está relacionada a fatores de risco metabólicos que podem levar ao estado de estresse oxidativo celular e assim alterar o processo cicatricial. O estilo de vida moderno caracterizado pela alta ingestão de alimentos hipercalóricos e baixo nível de atividade física (baixo gasto calórico) induz o acúmulo de lipídios no tecido adiposo, fígado, músculos e órgãos internos, predispondo ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos (HOTAMISLIGIL, 2003). A ingestão de tais dietas podem causar alterações metabólicas, mas não necessariamente geram quadros de obesidade (LAUTERIO et al., 1994).

No presente estudo os animais foram submetidos à dieta controle (NL) e hiperlipídica (HL) com 50% de gordura e após 45 dias, os animais do grupo HL, apesar de não apresentarem diferença quanto à massa corporal, mostraram aumento de glicemia, colesterol total e triglicérides em relação aos animais NL. Esses achados corroboram com o estudo de Otranto et al (2013) com camundungos submetidos à dieta hiperlipídica (42% de gordura) por 30 semanas e de Li et al. (2010) em ratos submetidos a dieta hiperlipídica (60% de gordura) por 16 semanas, que também constataram hipercolesterolemia a partir da 8ª semana de dieta. Em relação à

adiponectina sérica, os ratos do grupo HL apresentaram diminuição já na 6ª semana do estudo em comparação aos do grupo NL, resultados distintos aos encontrados por Li et al (2010) que evidenciaram tal diferença apenas na 16ª semana.

Além das alterações séricas citadas, o grupo HL apresentou modificações clínicas e histológicas nos fígados evidenciando quadro de esteatose hepática. Estes dados corroboram com os achados de Tan *et al* (2013) que submeteram ratos à dieta hiperlipídica (59% de gordura) durante 45 dias (6 semanas). Os resultados mostraram além das alterações séricas (hiperglicemia, dislipidemia), alterações histológicas hepáticas como, depósito de gordura em quase todos hepatócitos, representando quadro de esteatose macrovesicular com grandes gotas individuais de gordura deslocando o núcleo para a periferia, edema celular e vacuolização citoplasmática. Esses achados histopatológicos hepáticos foram os mesmos encontrados nos animais hiperlipídicos do presente estudo, porém, em um estágio mais avançado.

A ingestão de dietas hipercalóricas pode gerar quadro de esteatose hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) caracterizando-se por deposição ectópica de gordura hepatocelular correlacionado com obesidade, resistência à insulina, dislipidemia, intolerância à glicose. Na verdade, NAFLD atualmente é conceituada como uma manifestação hepática das alterações metabólicas citadas, sendo um sinal precoce de risco de desenvolver futuramente doenças como diabetes e alterações cardiovasculares (MARQUESINI et al., 2003; TAN et al., 2011; CHATRATH et al., 2012).

Em relação ao estudo da cicatrização das úlceras, o grupo HL apresentou atraso na cicatrização no 14º dia e menor quantidade de colágeno (hidroxiprolina) em relação ao grupo NL. Esses achados corroboram com a análise histopatológica qualitativa no 14º dia na qual mostrou atraso na reepitelização (formação da epiderme), poucos fibroblastos e colágeno desorganizado. Estes achados podem ser explicados pelos efeitos sistêmicos provocados pela dieta hiperlipídica como, hiperglicemia, hipercolesterolemia e baixa adiponectinemia.

A hipercolesterolemia parece gerar um ambiente de estresse oxidativo tecidual e conseqüentemente atraso no processo cicatricial (ROSEMBAUM et al., 2010; VILAHUR et al., 2012). Rosembaum et al. (2012) avaliaram os efeitos da hipercolesterolemia na cicatrização de lesão induzida na artéria carótida de camundongos. Os animais com hipercolesterolemia apresentaram aumento nos

marcadores de estresse oxidativo (TBARS) e atraso no processo cicatricial das áreas lesadas arteriais.

Em relação à adiponectina (APN), esta adipocina tem sido recentemente elencada como um biomarcador do status metabólico adequado, normalmente é encontrada em altas concentrações na circulação periférica. Nestas condições a APN parece modular o processo de cicatrização cutânea como mostrado por Salathia et al (2013) que realizaram vários experimentos animais em cicatrização cutânea e tratamento com distintas doses de adiponectina, o que promoveram importante proliferação de queratinócitos e colágeno mais organizado. Diferente disso, estudos envolvendo o acúmulo de gordura no organismo, seja em modelos animais ou humanos, têm demonstrado que esse fenômeno parece gerar um ambiente de estresse oxidativo sistêmico e consequentemente desregula a produção das adipocinas (FURUKAWA et al., 2004). Com isso, quadros de baixa adiponectinemia estão relacionados à obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo II (TRUJILLO; SCHERER, 2005; KUSMINSKI; SCHERER, 2009) que dificultam e atrasam o processo cicatricial cutâneo (NASCIMENTO; MONTE-ALTO-COSTA, 2006; NASCIMENTO; MONTE-ALTO-COSTA, 2011; OTRANTO et al., 2013; FIRAT et al., 2013).

De forma semelhante, embora em camundongos, Otranto et al. (2013) demonstraram que a dieta hiperlipídica proporcionou atraso na reepitelização das úlceras cutâneas além de menores níveis de hidroxiprolina. Em outro estudo, Nascimento et al. (2011) avaliaram a cicatrização cutânea em ratos submetidos a dieta hiperlipídica (30% gordura) por 20 semanas constataram que os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram diferentes aumentos na massa corporal, no entanto, o atraso no processo de reepitelização ocorreu em todos os animais do grupo hiperlipídico. No presente estudo os animais do grupo HL não apresentaram aumento significativo da massa corporal, porém, mostraram alterações metabólicas significativas às quais parecem ter influenciado no processo cicatricial com consequente atraso na reepitelização das úlceras e desorganização do colágeno.

Estudos têm demonstrado que ROS liberados em baixas concentrações participam de vários processos de sinalização celular durante a reparação tecidual (SEN; ROY, 2008; NOVO; SHAFER; WERNER, 2008; PAROLA, 2012). Porém,

quando liberados em quantidades excessivas podem alterar e atrasar o processo cicatricial.

Quanto ao estresse oxidativo, o grupo HL apresentou aumento nos níveis de MPO no 2º dia comparado ao grupo NL, implicando num maior infiltrado inflamatório que se manteve até o 14º dia e maior produção de ROS. Consequentemente, com o aumento de neutrófilos no sítio das lesões, o grupo HL também apresentou aumento nos níveis de MDA (relacionado à peroxidação lipídica) e H_2O_2 no 2º e 14º dia de seguimento em relação ao grupo NL. Esses achados provavelmente estão relacionados ao prolongamento da fase inflamatória nos animais do grupo HL o que poderia justificar o atraso na reepitelização e diminuição da colagênese no 14º dia de acompanhamento, resultados semelhantes aos encontrados por Otranto et al. (2013).

Considerando a relação entre inflamação e estresse oxidativo, Chen et al. (2012) mostraram que pacientes com alterações metabólicas, como resistência à insulina e dislipidemia, apresentaram baixa concentração de adiponectina e aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Estudos apontam uma estreita relação entre alterações metabólicas, adiponectinemia, inflamação e estresse oxidativo (KADOWAKI et al., 2006; KUSMINSKI; SCHERER, 2009; LI et al., 2010; CHEN et al., 2012), e Wagener et al., (2013) por meio de revisão, mostraram importante relação entre distúrbios cutâneos, inflamação e estresse oxidativo. Estas relações parecem ter ocorrido no presente estudo, no qual o grupo HL apresentou alterações metabólicas (hiperglicemia e dislipidemia), diminuição da concentração de adiponectina, aumento nos níveis de MPO (inflamação prolongada), MDA e H_2O_2 , culminando em atraso no processo de cicatrização das úlceras cutâneas.

Em relação aos níveis de antioxidantes, especificamente a GSH, mostraram-se elevados no grupo HL no 2º dia de seguimento possivelmente na tentativa de aumentar o processo de detoxificação e consequentemente diminuir as concentrações de ROS e o estresse oxidativo. Porém, como o ambiente de estresse oxidativo foi perpetuado, o grupo HL apresentou diminuição progressiva dos níveis de GSH até o 14º dia de seguimento. Baixas concentrações de GSH estão associadas a um maior risco de estresse oxidativo e à ocorrência de infecções oportunistas (MEISTER, 1995; SHÄFER, 2008). Estudos mostram que baixos níveis de antioxidantes associados a altos níveis de marcadores de danos por radicais livres

(ROS) desempenham papel significativo no retardo da cicatrização de úlceras cutâneas, muito provavelmente pela hiperestimulação da fase inflamatória.

Diante deste cenário, várias terapêuticas são testadas e empregadas com o intuito de acelerar o processo de cicatrização cutâneo principalmente de úlceras crônicas. A fototerapia (laser de baixa intensidade, por exemplo) vem sendo utilizada através dos anos, na tentativa de melhorar e acelerar o processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em modelos experimentais e estudos clínicos em humanos. Nas últimas décadas, estudos apontam que a fototerapia aplicada em úlceras cutâneas associadas a condições patológicas como diabetes e desnutrição promovem melhores efeitos quando comparado com o tecido normal (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2006; AL-WATBAN et al., 2007; TAFUR; MILLS, 2008; NOUDEH et al., 2010; KAVIANI et al., 2011; PRINDEZE et al. 2012) .

No presente estudo, os animais foram tratados com fototerapia por meio de laser diodo utilizando o comprimento de onda de 660 nm e dose de 2 J (70 J/cm²). Estes parâmetros foram escolhidos baseados na literatura específica e utilizados com sucesso em outros estudos realizados pelo grupo de cicatrização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Considerando os grupos normolipídicos, o grupo NLL+ apresentou maior colagênese em relação aos outros grupos no 14^o dia, porém, em relação à reepitelização, os resultados foram similares ao controle não irradiado (NLL-). Quanto aos achados histopatológicos, o grupo NLL+ apresentou grande quantidade de fibroblastos e colágeno mais organizado em relação ao grupo NLL-. Apesar de um maior estímulo à colagênese, que está bem estabelecido na literatura (HAWKINS; ABRAHAMESE, 2007; YASUKAWA et al., 2007; HOURELD et. al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2013), este fato não acelerou processo de cicatrização em relação aos animais controle.

Quanto aos mecanismos de ação da fototerapia, vários autores sugerem que componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias (citocromo c oxidase) funcionem como fotorreceptores primários da estimulação. A irradiação de luz transmitida via energia dos fótons para a célula é transformada em energia bioquímica, que será utilizada na cadeia respiratória mitocondrial. Na região do visível e do infravermelho (IV) próximo (630-1000nm), a fotobioestimulação ativa a cadeia respiratória por meio da absorção da luz no citocromo c oxidase, aumentando a

transferência de elétrons e metabolismo oxidativo da mitocôndria. Portanto, as células absorvem os fótons e os transforma em ATP (adenosina trifosfato), que será utilizado nos processos metabólicos, síntese de DNA, RNA, proteínas, enzimas, e outros produtos necessários para o reparo ou regeneração dos componentes celulares, acelerar mitoses ou proliferação celular e restaurar a homeostasia (KARU, 2003; WONG-HILEY et al., 2005; DESMET et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007; TAFUR; MILLS, 2008; KARU; PYATIBRAT, 2011; PRINDEZE et al., 2012).

Já o grupo HLL+ apresentou reepitelização mais rápida com maiores ICUs, comparado aos demais grupos, além do aumento na colagênese em relação aos controles (NLL- e HLL-). A explicação desses fenômenos encontra-se na magnitude dos efeitos bioestimulatórios da luz que dependem do estado fisiológico das células irradiadas e que células com potencial redox reduzido (aumento de ROS), o que ocorre em certas condições patológicas (como diabetes, obesidade, entre outras), tornam-se mais sensíveis às irradiações luminosas (REDDY et al., 2001; KARU, 2003; PINHEIRO et al., 2004; TAFUR; MILLS, 2008; PRINDEZE et al., 2012) e apresentam melhores efeitos quando comparado as células com potencial redox normal. O estresse gerado pelas alterações metabólicas pode desencadear uma forma mais oxidada do fotorreceptor citocromo C oxidase, resultando no aumento da fotosensibilidade mitocondrial à fototerapia o que geraria um aumento na produção de ATP e ROS, aumentando o metabolismo. Porém, esses ROS adicionais alteram a função celular, sendo que em alguns casos podem promover proliferação e, por outro, podem estimular os mecanismos antioxidantes que promovem o equilíbrio redox e aumentam o funcionamento celular (TAFUR, MILLS, 2008). A fototerapia parece ter participado da modulação do estresse oxidativo tecidual gerado pelos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica e, conseqüentemente, melhorado o processo de cicatrização cutânea dos animais hiperlipídicos irradiados. Os estudos *in vitro* realizados por Karu indicaram que comprimentos de onda de 710-790nm estimularam fotorreceptores (citocromo C oxidase) nas formas reduzidas e ondas de 560-680 nm estimularam o citocromo C oxidase nas formas oxidadas, portanto há uma faixa de comprimento de onda de 790-560 nm com efeitos sobre o redox celular (KARU, 2005; KARU et al., 2008; KARU et al., 2010). Porém, raros estudos mostraram esses efeitos em modelos *in vivo*.

O presente estudo mostrou esses efeitos no modelo experimental patológico (dismetabolismo) *in vivo* por meio dos resultados dos marcadores de estresse oxidativo dos grupos irradiados utilizando comprimento de onda de 660 nm. O grupo normolipídico irradiado (NLL+) apresentou aumento nas concentrações de MPO em relação ao controle (NLL-) e ao grupo hiperlipídico irradiado (HLL+). Estes dados mostram o efeito pró-inflamatório da fototerapia, representado pelo aumento dos neutrófilos no início do tratamento (2º dia), sendo que já no 7º dia os níveis de MPO já haviam diminuído consideravelmente. Este efeito da fototerapia (NLL+) possivelmente justifica o aumento nos níveis de MDA e FOX no 2º dia de seguimento em relação ao controle (NLL-). Por outro lado, o grupo hiperlipídico irradiado (HLL+) apresentou diminuição nos níveis de MPO, MDA e FOX principalmente no 2º dia, (fase inflamatória), apresentando valores similares ao grupo normolipídico não irradiado (NLL-). Esses achados já evidentes no 2º dia demonstram a interferência da fototerapia sobre o excesso de ROS desencadeados pelo dismetabolismo, modulando satisfatoriamente a fase inflamatória da cicatrização. Além disso, o grupo HLL+ apresentou aumento significativo dos níveis de GSH comparado aos demais grupos. Estudos de Oren et al. (2001) e Lubart et al. (2005) revelaram que a fototerapia aumentou a capacidade redutora das células, melhorando a atividade antioxidante do tecido. Ambos concluíram que este fato pode ocorrer tanto pelo aumento da atividade de vários antioxidantes quanto pela estimulação da produção dos mesmos.

Em modelos normais, Silveira et al. (2011) avaliaram os efeitos da fototerapia em diferentes comprimentos de onda e doses em parâmetros do estresse oxidativo e fibrogênese no processo cicatricial de úlceras em ratos. Os resultados mostraram que o laser HeNe na dose de 1 e 3 J/cm² e o laser AsGa na dose de 3 J/cm² proporcionaram diminuição nos marcadores de estresse oxidativo (diminuição da inflamação) e indução da colagênese acelerando o processo cicatricial cutâneo em ratos normais. No presente estudo, a fototerapia também induziu colagênese nos animais normais, porém, não apresentou reepitelização mais rápida nem modulação do estresse oxidativo em relação ao controle, provavelmente devido a utilização de laser AsGa em dose menor (2 J).

Gonçalves et al. (2013) avaliaram os efeitos da fototerapia por meio do laser diodo GaAsAl nas doses de 30 J/cm² ou 90 J/cm² na cicatrização de úlceras cutâneas e resposta oxidativa em ratos durante 21 dias. Os resultados mostraram que

a fototerapia no 7º dia de seguimento induziu aumento da proliferação celular, vasos sanguíneos e colagênese em relação ao controle e, além disso, no 7º e 14º os animais irradiados mostraram diminuição nos níveis de TBARS e aumento nos níveis de catalase (antioxidante).

Firat et al. (2013) analisaram os efeitos positivos do laser GaAIs na cicatrização de úlceras cutâneas e modulação do redox celular em modelo patológico de diabetes. Os resultados apontaram efeitos positivos da fototerapia na fase inflamatória, síntese de colágeno, angiogênese e modulação do estresse oxidativo nos animais diabéticos irradiados em comparação aos não irradiados. Esses dados se aproximam dos resultados do presente estudo, cujos animais hiperlipídicos irradiados além de apresentar uma modulação do desequilíbrio oxidativo, apresentaram melhor colagênese e reepitelização mais rápida das úlceras cutâneas em relação aos animais hiperlipídicos não irradiados e semelhantes aos animais normolipídicos não irradiados (cicatrização natural).

Os resultados do presente estudo mostraram a viabilidade do modelo de estresse oxidativo experimental por meio de dieta hiperlipídica para o estudo da cicatrização de úlceras cutâneas e aplicação de terapêuticas no intuito de acelerar o processo de reparação tecidual. A fototerapia mostrou-se uma terapêutica eficaz e segura e parece ter modulado o estresse oxidativo e consequentemente acelerado a cicatrização cutânea nos animais hiperlipídicos (condição patológica), porém, a literatura ainda é escassa principalmente em estudos humanos no que diz respeito à fototerapia e estresse oxidativo. Por isso, torna-se necessário a realização de estudos clínicos randomizados para confirmar a eficácia e segurança da fototerapia em pacientes com distúrbios metabólicos como, nos casos de diabetes, síndrome metabólica e obesidade.

Conclusão

No experimento realizado foi padronizado um modelo de estresse oxidativo experimental por meio de dieta hiperlipídica para o estudo da cicatrização de úlceras cutâneas. Os resultados mostraram primeiramente a influência negativa da dieta confirmada por alterações metabólicas como hiperglicemia, dislipidemia e baixa adiponectinemia, além de alterações clínicas e histológicas no tecido hepático dos animais hiperlipídicos.

Por sua vez, essas alterações metabólicas provocaram um ambiente de estresse oxidativo tecidual comprovado por marcadores, o que resultou em distúrbios na cicatrização representados pela diminuição da colagênese e atraso na reepitelização das úlceras cutâneas dos animais hiperlipídicos.

Quanto à fototerapia aplicada por meio do laser diodo, 660 nm, dose de 2 J, fluência de 70 J/cm², obtiveram-se resultados distintos em relação aos grupos. O grupo normolipídico irradiado apresentou resultados similares quanto à reepitelização das úlceras e modulação do estresse oxidativo, em comparação ao grupo não irradiado (cicatrização natural). Já o grupo hiperlipídico irradiado acelerou a cicatrização de úlceras cutâneas por meio da modulação do estresse oxidativo em comparação ao grupo hiperlipídico não irradiado e aos grupos normolipídicos, sugerindo que efeitos benéficos similares podem ser encontrados em pacientes com alterações metabólicas. Porém, estudos clínicos randomizados são necessários para confirmação da eficácia e segurança dessa terapêutica em tais pacientes.

*Referências**

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALMEIDA-LOPES L.; LOPES A. Atualização clínica em odontologia: Técnica de drenagem linfática ativada por laserterapia. São Paulo: Artes Médicas, 2006. p. 327-340.

ALMEIDA-LOPES L.; RIGAU J.; ZÂNGARO R. J.; GUIDUGLI-NETO J.; JAEGER M. M. Comparison of low level laser therapy effects of cultured humans gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

ANDRADE T. A.; LYER A.; DAS P. K.; FOSS N. T.; GARCIA S. B.; COUTINHO-NETTO J.; JORDÃO-JR A. A.; FRADE M. A. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

AL-WATBAN F. A. H.; ANDRES B. L. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p. 10-16, 2006.

AL-WATBAN F. A. H., ZHANG X. Y.; ANDRES B. L. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: A comparison of different lasers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 72-77, 2007.

ARAÚJO C. E. N.; RIBEIRO M. S.; FAVARO R.; ZECELL D. M.; ZORN T. M. T. Ultrastructural and and autoradiographical analysis show a faster skin repair in HeNe laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, p. 87-96, 2007.

ARNOLD, F.; WEST, D. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**, v.52, p.407-422, 1991.

BAGNATO V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9, 2001.

BARANOSKI, S., AYELLO E. A. Wound Care Essentials. 1st ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

BAYAT M.; VASHEGHANI M. M.; RAZAVI N.; TAHERI S.; RAKHSHAN M. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: a histological and microbiological study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, p. 171-177, 2005.

BEANES S. R.; DANG C.; SOO C.; TING K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF – β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-11, 2003.

BEHM B.; BABILAS P.; LANDTHALER M.; SCHREML S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, 812-820, 2012.

BEAK S M.; PAEK S H.; JAHNG Y.; LEE Y S.; KIM J. A. Inhibition of UVA irradiation-modulated signaling pathways by rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, in human keratinocytes. **Eur J Pharmacol**, v. 498, n. 1-3, p. 19-25, 2004.

BIALY T. L.; ROTHE M. J.; GRANT-KELS J. M. Dietary factors in the prevention and treatment of nonmelanoma skin cancer and melanoma. **Dermatol Surg**, v. 28, n. 12, p. 1143-52, 2002.

BROUGHTON G.; JANIS J. E.; Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 1e-S - 32e-S, 2006.

BRYANT R. A. Wound Healing Physiology: Acute & Chronic wounds. St Louis: Nursing Management. 2000. p. 17-39.

BUEGE J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURTON G. W.; TRABER M. G.; ACUFF R. V.; WALTERS D. N.; KAYDEN H.; HUGHES L.; INGOLD K. U. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am J Clin Nutr**, v. 67, n. 4, p. 669-84, 1998.

CAETANO K. S.; FRADE M. A.; MINATEL D. G.; SANTANA L. A.; ENWEMEKA C. S. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n.1, p. 111-118, 2009.

CHAN B. M.; KASSNER P. D.; SCHIRO J. A.; BYERS H. R.; KUPPER T. S.; HEMLER M. E. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. **Cell**, v.68, p.1051-60, 1992.

CHETTIBI S.; FERGUSON M. W. J. Wound Repair: an overview. In: Inflammation: **Basics principles and clinical correlates**. Second Edition, Plenum Press, New York, p. 95-141, 1999.

CHEN S. J.; YEN C. H.; HUANG Y. C.; LEE B. J.; HSIA S.; LIN P. T. Relationships between Inflammation, Adiponectin, and Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 1-5, 2012.

CIGHETTI, G. et al. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. **Anal Biochem**, v. 266, n. 2, p. 222-229, 1999.

CHATRATH H.; VUPPALANCHI R.; CHALASANI N. Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 32, n. 1, p. 22–29, 2012.

CHILDRESS B. B.; STECHMILLER J. K. Role of nitric role in wound healing. **Biological Research for Nursing**, v. 4, n 1, p. 5-15, 2002.

COSTA R. Eletroacupuntura e outros recursos eletro-eletrônicos aplicáveis à medicina chinesa: Laser. São Paulo: Plêiade, 2002. p. 61-76.

COTTON A. M. A review of the principles and use of lasers in lower limb problems. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 3, p. 133-142, 2004.

CURTI M. L. R.; JACOB P.; BORGES M. C. ROGERO M. M.; FERREIRA, S. R. G. Studies of Gene Variants Related to Inflammation, Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Obesity: Implications for a Nutrigenetic Approach. **Journal of Obesity**, v. 2011, p. 1-31, 2011.

DADPAY M.; SHARIFIAN Z.; BAYAT M.; DABBAGH A. Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats by biomechanical evaluation. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 111, p. 1–8, 2012.

DESMET K. D.; PAZ DA CORRY J. J.; EELLS J. T.; WONG-HILEY M. T.; HENRY M. M.; et al. Clinical and experimental applications NIR-LED photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 121-128, 2006.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, v. 9, p. 283-289, 2004.

DIEMEN V. V.; TRINDADE E. N.; TRINDADE M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 67-78, 2006.

EAGLSTEIN, W., FALANGA V. Chronic wounds: **Surgical Clinics of North America**, v.77, n. 3, p. 689. 1997.

EMING S. A.; KRIEG T.; DAVIDSON J. M.; Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-25, 2007.

ESCHE C, STELLATO C, BECK LA. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity: **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p. 615-28, 2005.

FEOLI, A. et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **J Nutr**, v. 136, n. 9, p. 2357-2361, 2006.

FIRAT E. T.; DAG A.; GUNAY A.; KAYA B.; KARADEDE M. I.; KANAY B. E.; et al. The effects of low-Level laser therapy on palatal mucoperiosteal wound healing and oxidative stress status in experimental diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 7, p. 315-321, 2013.

FRIEDMANN H.; LUBART R.; LAULICHT I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 11, p. 87-95, 1991.

GIANCOTTI F.G.; RUOSLAHTI E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v. 60, p. 849-59, 1990.

GONÇALVES R. V.; NOVAES R. D.; CUPERTINO M. C.; MORAES B.; LEITE J. P. V.; PELUZIO M. C. G.; et al. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Laser in medical science**, v. 28, n. 2, p. 383-90.

GRECO M.; GUIDA G.; PERLINO E.; MARRA E.; QUAGLIARIELLO E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 163, n. 3, p. 1428-1434, 1989.

GROSSMAN N.; SCHNEID N.; REUVENI H.; HALEVY S.; LUBART R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 212-218, 1998.

GUO S.; DIPIETRO L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GUPTA A.; SINGH R.L.; RAGHUBIR R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **Mol. Cell. Biochem**, v. 241, p. 1-7, 2002.

GURTNER G. C.; WERNER S.; BARRANDON Y.; LONGAKER M. T.; Wound Repair and Regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314-21, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in biology and medicine, 3rd ed., Oxford Science Publications: Oxford, 1998.

HEWITT K. M.; STRINGER M. D. Correlation between the surface area of synovial membrane and the surface area of articular cartilage in synovial joints of the mouse and human. **Surgical & Radiologic Anatomy**, v. 30, p. 645-651, 2008.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMESE, H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, p. 147-155, 2007.

HOFFMANN M. E.; MENEGHINI R. Action of hydrogen peroxide on human fibroblast in culture. **Photochem Photobiol**, v. 30, p. 151–155, 1979.

HOURELD N.; SEKHEJANE P. R.; ABRAHAMSE H. Irradiation at 830nm Stimulates Nitric Oxide Production and Inhibits Pro-Inflammatory

Cytokines in Diabetic Wounded Fibroblast Cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, p. 494-502, 2010.

HOTAMISLIGIL G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **International Journal of Obesity**, vol. 27, supplement 3, p. S53–S55, 2003.

ICHIHASHI M.; UEDA M.; BUDIYANTO A.; BITO T.; OKA M.; FUKUNAGA M.; TSURU K.; HORIKAWA T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 21-39, 2003.

JAUL, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 49, n. 2, p. 224–226, 2009.

JIANG, Z. et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

KADOWAKI T.; YAMAUCHI T.; KUBOTA N.; HARA K.; UEKI K.; TOBE K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.

KAMATA H.; HIRATA H. Redox regulation cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1999.

KARU T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. QE-23, n. 10, p. 1703-17, 1987.

KARU T. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers and the Life Science**, v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

KARU T. Photobiological of low power laser effects. **Health Physics**, v.56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, p. 1-17, 1999.

KARU T. Low power laser therapy. In: Biomedical Photonics Handbook, cap. 48, p. 48-1 – 48-25, 2003.

KARU T. I.; PYATIBRAT L. V.; KOLYAKOV S. F.; AFANASYEVA N. I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **J Photochem Photobiol B**, v.81, p.98-106, 2005.

KARU T. I.; PYATIBRAT L. V.; KOLYAKOV S. F.; AFANASYEVA N. I. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8nm. **Photomed Laser Surg**, v.26, 593-599, 2008.

KARU T. I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life**, v. 62, p. 607–10, 2010.

KARU T., PYATIBRAT L. Gene Expression Under Laser and Light-emitting Diodes Radiation for Modulation of Cell Adhesion: Possible Applications for Biotechnology. **Life**, v. 63, n. 9, p. 747-753, 2011.

KARUKONDA S. R.; FLYNN T. C.; BOH E. E.; MCBURNEY E. I.; RUSSO G. G.; MILLIKAN L. E. The effects of drugs on wound healing: Part 1. **International Journal of Dermatology**, 39, 250-7, 2000.

KAVIANI A.; DJAVID G. E.; ATAIE-FASHTAMI L.; FATEH M.; GHODSI M. SALAMI M. A Randomized Clinical Trial on the Effect of Low-Level Laser Therapy on Chronic Diabetic Foot Wound Healing: A Preliminary Report. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 2, p. 109-114, 2011.

KING BA, OH DH. Spatial control of reactive oxygen species formation in fibroblasts using two-photon excitation. **Photochem Photobiol**, v. 80, p. 1-6, 2004.

KREISLER M.; CHRISTOFFERS A. B.; WILLERSHAUSEN B.; d'HOEDT B. Low-level 809-nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, p. 365-369, 2003.

KREISLER M.; CHRISTOFFERS A. B.; WILLERSHAUSEN B.; d'HOEDT B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 353-358, 2003.

KROKAN H. E.; STANDAL R.; SLUPPHAUG G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochem J**, v. 325, 1-16, 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Robbins & Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. 7th ed. Rio de Janeiro. Saunders, p. 49-124, 2005.

KUSMINSKI C. M.; SCHERER P. E. The Road From Discovery to Clinic: Adiponectin as a Biomarker of Metabolic Status. **Clinical pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n.6, 592-595, 2009.

KVAM E, DAHLE J. Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-A-induced membrane damage. **J Invest Dermatol**, v. 121, n. 3, p. 564-9, 2003.

LAZARUS G.S.; COOPER D. M.; KNIGHTON D. R.; MARGOLIS D.J.; PECORARO R. E.; RODEHEAVER G.; ROBSON M. C. Definitions and guidelines for the assessment of wounds and evaluation of healing. **Archives of Dermatology**, v. 130, p. 489-93, 1994.

LEE Y. S.; WYSOCKI A.; WARURTON D.; TUAN T. L. Wound Healing in Development. **Birth Defects Research**, v. 96, p. 213-222, 2012.

LEITE S. N.; JORDÃO JÚNIOR A. A.; ANDRADE T. A.; MASSON D. S.; FRADE M. A. Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 4, p. 681-688, 2011.

LI J.; CHEN J.; KISNER R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LI R.; XU M.; WANG X.; WANG Y.; LAU W. B.; YUAN Y.; YI W.; WEI X.; LOPEZ B. L.; CHRISTOPHER T. A.; WANG X.; MA X. Reduced vascular responsiveness to adiponectin in hyperlipidemic rats—mechanisms and significance. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, p. 508-515, 2010.

LIBANORE, D. Z. Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830 nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal. 2008, 87 f. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

LIMA E. S.; ABDALLA D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIU X; WANG F; LI Y; SUN C. Oxidative stress and the susceptibility to obesity in rats. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 40, n. 4, p. 420-22, 2011.

LITTLE M, O. Nutrition and skin ulcers. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, p. 39-49, 2013.

LOBKO V. V.; KARU T.; LETOKHOV V. S. Is low-intensity laser light coherence essential when biological objects are affected? **Biofizika**, v. 30, p. 366-391, 1985.

LUBART R.; FRIEDMANN H.; GROSSMANN N.; ADAMER M.; SHAINBERG A. The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation. **Laser Technology**, v. 6, n. 3, p. 79-84, 1996.

LUBART R.; FRIEDMANN H.; SINYAKOV M.; SHIMAN A.; GROSSMANN N.; ADAMEK M.; SHAINBERG A. The effect of He-Ne laser (633 nm) radiation on intracellular Ca^{2+} concentration in fibroblasts. **Laser Therapy**, v. 9, p. 115-120, 1997.

LUBART R.; FRIEDMANN H.; PELED I.; GROSSMANN N. Light effect on fibroblast proliferation. **Laser Therapy**, v. 5, p. 55-57, 1993.

LUBART R.; EICHLER M.; LAVI R.; FRIEDMAN H.; SHAINBERG A. Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.

LUCAS, C., VAN GEMERT MJ., DE HAAN R.J. Efficacy of low-laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomized clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 2, p. 72-77, 2003.

MACKAY, D., MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing. **Alternative Medicine Review**, v.8, n.4, p.359-377, 2003.

MANTEIFEL V.; BAKEEVA L.; KARU T. Ultrastructural changes in chondriome of humans lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 38, p. 25-30, 1997.

MARQUESINI G.; BUGIANESI E.; Forlani G. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917–923, 2003.

MATSUZAWA A.; ICHIJO H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7, n. 3 e 4, p. 472-481, 2005.

MELLO J. B.; MELLO G. P. S. Laser em odontologia. 1ª ed. São Paulo: Santos, 2001.

MENKE N. B.; WARD K. R.; WITTEN T. M.; BONCHEV D. G.; DIEGELMANN R. F. Impaired Wound Healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 19-25, 2007.

MEISTER A. Glutathione metabolism. **Methods Enzymol**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MESTER E. The use of the laser beam in therapy. **Orvosi Hetilap**, v. 107, n. 22, p. 1012-1016, 1966.

MESTER E.; MESTER A. F.; MESTER A. Biomedical effects of laser application. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MINATEL D. G.; FRADE M. A.; FRANÇA S. C.; ENWEMEKA C. S. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 6, 433-41, 2009.

MOSELEY R.; HILTON J. R.; WADDINGTON R. J.; HARDING K. G.; STEPHENS P.; THOMAS D. W. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wounds environments. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, p. 419-429, 2004.

MOON J.; SHIBAMOTO T. Antioxidant assays for plant and food components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MORENO S. E.; ALVES-FILHO J. C.; BERTOZI G.; ALFAYA T. M.; THEZE J.; FERREIRA S. H.; VARGAFTIG B. B. Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 8, p. 1060-1066, 2006.

MUDGE B. P.; HARRIS C.; GILMONT R. R.; ADAMSON B. S.; REES R. S. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, p. 52-58, 2002.

NASCIMENTO A. P.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Both obesity-prone and obesity resistant rats present delayed cutaneous wound healing. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 603-11, 2011.

NASCIMENTO A. P.; MONTE-ALTO-COSTA A. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 1069-1077, 2006.

NOVO E.; PAROLA M. The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, suppl 1, 2012.

NOURSADEGHI M.; TSANG J.; HAUSTEIN T.; MILLER R. F.; CHAIN B.; KATZ D. R. Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v. 328, p. 189-200, 2008.

OLIVEIRA P. C.; PINHEIRO A. L. B.; CASTRO I. C. V.; JÚNIOR J. A. R.; NOIA M. P.; GURGEL C. Evaluation of the effects of polarized light (400–200 nm) on the healing of third-degree burns in induced diabetic and nondiabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 9, p. 619-625, 2011.

OREN D. A.; CHARNEY D. S.; LAVIE R. et al. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. **Biol. Psychiatry**, v. 49, p. 464–467, 2001.

OTRANTO M.; NASCIMENTO A. P.; MONTE-ALTO-COSTA A. Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, p. 464-472, 2013.

PAPADOPULOS F.; SPINELLI M.; VALENTE S.; FORONI L.; ORRICO C.; ALVIANO F.; PASQUINELLI G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. **Ultrastructural Pathology**, v. 31, n. 6, p. 401-407, 2007.

PARKS W. C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 423-32, 1999.

PASSARELA S.; CASAMASSIMA E.; MOLINARI S.; PASTORE D.; QUAGLIARIELLO E.; CATALANO I. M.; CINGOLANI A. Increase of próton electrochemical and ATP syntesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon laser. **Febs Letters**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PERFETTO F.; MANCUSO F.; TARQUINI R. Leukocytosis and hiperleptinemia in obesity: is there a link? **Haematologica**, v. 87, ELT25, 2002.

PINHEIRO A. L. B.; MEIRELES G. C. S.; VIEIRA A. L. B.; ALMEIDA D. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished Wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v.15 (special issue), p. SI21-SI28, 2004.

PINHEIRO A. L. B.; MEIRELES G. C. S.; CARVALHO C. M.; VIEIRA A. L. B.; SANTOS J. M.; RAMALHO L. M. P. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 616-624, 2006.

PODDA M.; ZOLLNER T. M.; GRUNDMANN-KOLLMANN M.; THIELE J. J.; PACKER L.; KAUFMANN R. Activity of alpha-lipoic acid in the protection against oxidative stress in skin. **Curr Probl Dermatol**, v. 29, p. 43-51, 2001.

POUYSSSEGUR J. The growth factor-activatable Na⁺K⁺ exchange system: a genetic approach. **Trends Biochemical Sciences**, v.10, p. 453-455, 1985.

PRINDEZE N. J.; MOFFATT L. T.; SHUPP J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 1241-1248, 2012.

RAJARATNAM S.; BOLTON P.; DYSON M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. **Laser Therapy**, v. 6, p. 107-112, 1994.

RANZATO E.; MARTINOTTI S.; BURLANDO B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. **J Ethnopharmacol**, v. 134, n. 2, p. 443-449, 2011.

RASILAINEN S.; NIEMINEN J. M.; LEVONEN A. L.; OTONKOSKI T.; LAPATTO R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 7, p. 1297-304, 2002.

REDDY G. K.; ENWEMEKA C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin Biochem**, v. 29, n. 3, p.225-229,1996.

REDDY G. K.; STEHNO-BITTEL L.; ENWEMEKA C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 3, p. 248-255, 2001.

REITER R. J. Antioxidant actions of melatonin. **Adv Pharmacol**, v. 38, p. 103-17, 1997.

RHEE S. G. H_2O_2 , a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, p. 1882-1883, 2006.

ROBSON M. C.; BARBUL A. Guidelines for the best care of chronics wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 647-8, 2006.

ROJKIND M.; DOMINGUEZ-ROSALES J. A.; NIETO N.; GREENWEL P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, p. 1872-1891, 2002.

ROSEMBAUM M. A.; MIYAZAKI K.; COLLES S. M.; GRAHAM L. M. Antioxidant therapy reverses impaired graft healing in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Vascular Surgery**, v. 51, n. 1, p. 1-18, 2010.

ROSEMBAUM M. A.; MIYAZAKI K.; GRAHAM L. M. Hypercholesterolemia inhibits endothelial cell healing after arterial injury though reactive oxygen species. **Journal of Vascular Surgery**, v. 55, n. 2, p. 489-96, 2012.

ROVER,-JR L.; KUBOTA, L. T.; HÖEHR, N.; F. Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum. **Clin Chim Acta**, v. 308, n. 1-2, p. 55-67, 2001.

ROZENGURT E.; MENDOSA S. Monovalent ion fluxes and the control of cell proliferation in cultures fibroblasts. **Annals of The New York Academy Sciences**, v. 339, p.175-190, 1980.

ROSZIK J.; SZOLLOSI J. VEREB G. AccPbFRET: an ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 346, p. 1-16, 2008.

SALATHIA N. S.; SHI J.; ZHANG J.; GLYNNE R. J. An in vivo screen of secreted proteins identifies adiponectin as a regulator of murine cutaneous wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 812-821, 2013.

SHIBATA S.; TADA Y.; ASANO Y.; KUBOTA C. S. N.; KADOWAKI T.; HAU S. S. et al. Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 189, p. 3231-3241, 2012.

SCHAFER M.; WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 165-171, 2008.

SEDLACK J.; LINDSAY R. Estimation of total, protein –bound and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analitical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEN C. K.; ROY S. Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, p. 1348-1361, 2008.

SERGEEV P. V.; UKHINA T. V.; SHIMANOVSKIĬ N. L. Effect of steroid sex hormones on lipid peroxidation and antiperoxide system of glutathione in rat skin tissues. **Biull Eksp Biol Med**, v. 128, n. 12 p. 663-6, 1999.

SHERWOOD E. R.; TOLIVER-KINSKY T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SCHULTZ G. S.; DAVIDSON J. M.; KIRSNER R. S.; BORNSTEIN P.; HERMAN I. M. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134-148, 2011.

SIEUWERTS S.; DE BOK F. A.; MOLS E.; DE VOS W. M.; VAN HYLCKAMA VLIEG J. E. A simple and fast method for determining

colony forming units. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 275-278, 2008.

SINNO H.; PRAKASH S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plastic Surgery International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

SILVA A. A.; LEAL-JÚNIOR E. C.; ALVES A. C.; RAMBO C. S.; SANTOS S. A.; VIEIRA R. P.; et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet Laser Ther**, v. 15, n. 4, p. 210-16, 2013.

SILVEIRA P. C. L.; STRECK E. L.; PINHO R. A. Evaluation of mitochondria respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, p. 279-282, 2007.

SILVEIRA P. C. L.; SILVA L. A.; FREITAS T. P.; LATINI A.; PINHO R. A. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. **Lasers and Medical Science**, v. 26, p. 125-131, 2011.

SOBANKO J. F.; ALSTER T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: A review and discussion. **Dermatologic Surgery**, v. 34, p. 991-1000, 2008.

SOUSA A. P. C.; NETO A. A. P. A. V.; MARCHIONNI A. M. T.; RAMOS M. A.; JÚNIOR J. A. R.; PEREIRA M. C. M. C.; et al. Effect of LED Phototherapy (I70020 nm) on TGF-b Expression During Wound Healing: An Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 9, p. 605-611, 2011.

STADELMANN W. K.; DIGENIS A. G.; TOBIN G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176 (Suppl 2-A), p. 26S-38S, 1998.

STRONCEK, J.D.; BELL, N.; REICHERT, W.M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 90, p. 1230-1238, 2009.

SWINBURN B.; EGGER G. Preventive strategies against weight gain and obesity. **Obes Rev**, v.3, p. 289-301, 2002.

TAFUR J.; MILLS P. J. Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, 2008.

TAN Y.; SUN L.; KAMAL M. A.; SEALE J. P.; QU X. Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice. **BBA—Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, p. 1045–1053, 2011.

TAN Y.; LAO W.; XIAO L.; WANG Z.; Wei XIAO W.; KAMAL M. A.; et al. Managing the combination of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome with chinese herbal extracts in high-fat-diet fed rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TRUJILLO, M.E.; SCHERER, P.E. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. **J. Intern. Med**, v. 257, p. 167–175, 2005.

UITTO J., PULKKINEN L., MCLEAN W. H. Epidermolysis bullosa: a spectrum of clinical phenotypes explained by molecular heterogeneity. **Molecular Medicine Today**, v. 3, p. 457-65, 1997.

VACCA R. A.; MARRA E.; QUAGLIARIELLO E.; GRECO M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, n. 2, p. 704-709, 1993.

VILAHUR, G.; CASANI L.; JUAN-BABOT O.; GUERRA J. M.; BADIMON L. Infiltrated cardiac lipids impair myofibroblast-induced healing of the myocardial scar post-myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 224, p. 368-76, 2012.

VINHA P. P. Estresse orgânico e atividade anti e pró-oxidante na queimadura aguda e no pós-operatório de cirurgia reparadora de seqüelas do trauma térmico. Ribeirão Preto. Mestrado. Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

WAGENER F. A. D. T. G.; CARELS C. E.; LUNDTVIG D. M. S. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9126-9167, 2013.

WEI Y H.; LU C. Y.; LEE H. C.; PANG C. Y.; MA Y. S. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p.155-70, 1998.

WEINGARTEN M. S.; PAPAZOGLU E. S. ZUBKOV L.; ZHU L.; NEIDRAUER M.; SAVIR G.; et al. Correlation of near infrared absorption and diffuse reflectance spectroscopy scattering with tissue neovascularization and collagen concentration in a diabetic rat wound healing model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, p. 234-242, 2008.

WERNER S.; KRIEG T.; SMOLA H. Keratinocytes-fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 998-1008, 2007.

WLASCHEK M.; SCHARFFETTER-KOCHANKE K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 452-461, 2005.

WILSON J. A.; CLARK J. J. Obesity: impediment to postsurgical wound healing. **Adv Skin Wound Care**, v. 17, p. 426–432, 2004.

WITTE, M. B., BARBUL, A. General principles of wound healing: **The Surgical Clinics of North America**, v.77, n.3, p.509-528. 1997.

WONG-HILEY M. T. T.; LIANG H. L.; EELLS J. T.; CHANCE B.; HENRY M. M.; BUCHMANN E.; KANE M.; WHELAN H. T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins. Role of cytochrome c oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4761-4771, 2005.

WORLD ASSOCIATION OF LASER THERAPY. Consensus agreement on the design and conduct of clinical studies with low level laser therapy and light therapy for musculoskeletal pain and disorders. http://waltza.co.za/wpcontent/uploads/2012/08/walt_standard_for_conduct_of_randomized_controlled_trials.pdf, 2004.

YASUKAWA A.; OHRUI 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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 8, p. 799-806, 2007.

YUDKIN J. S.; KUMARI M.; HUMPHRIES S. E. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukine-6 the link? **Atherosclerosis**, v. 148, p. 209-214, 2000.

ZEYDA M.; STULNIG T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett**, v. 112, p. 61-67, 2007.

Apêndices

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Anais Brasileiros de Dermatologia: An Bras Dermatol*, v. 86, n. 4, p. 681-8, 2011.

INVESTIGATION

681

Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism*

Modelos experimentais de desnutrição e sua influência no trofismo cutâneo

Saulo Nani Leite¹

Thiago Antônio Moretti de Andrade³

Marco Andrey Cipriani Frade⁴

Alceu Afonso Jordão Júnior²

Daniela dos Santos Masson³

Abstract: BACKGROUND: The skin requires adequate levels of nutrients to function properly. Objective: To analyze skin trophism in well-nourished and undernourished rats using two models of malnutrition.

METHODS: In the marasmus model, 60 Wistar rats were kept on a controlled diet, 30 being randomly selected to receive half the established diet for 60 days. In the gelatin model, 60 rats were used, 30 of which received a diet consisting of poor quality protein (gelatin) for 30 days. The nutritional status of the animals was evaluated according to body mass index, clinical signs and serum albumin measurement. After the period of malnutrition, histology was performed on the animals' skin to analyze the thickness of the dermis and epidermis using the Leica Application Suite software. Collagen was analyzed on slides stained with Gömöri trichrome using the ImageJ software program.

RESULTS: The body mass index of the malnourished animals in the marasmus and gelatin groups was significantly lower than that of the well-nourished animals in the two groups ($p < 0.0001$ in both models). With respect to serum albumin, there was no difference between the groups in either of the two models. In relation to the histological analysis of skin thickness, the dermis of the malnourished animals was significantly thinner compared to that of the well-nourished animals ($p < 0.0001$ in both models). The percentage of collagen was lower in the malnourished animals compared to the well-nourished animals ($p < 0.0005$ and $p < 0.003$ in the marasmus and gelatin model, respectively).

CONCLUSIONS: Skin thickness measurements were lower in the malnourished animals in both models, and this finding was histologically confirmed by the lower percentage of collagen, showing the negative effect of malnutrition on skin trophism. **Keywords:** Collagen; gelatin; image processing, computer-assisted; nutritional marasmus; public health; skin.

Resumo: FUNDAMENTOS: A pele, para exercer suas funções, necessita de níveis adequados de nutrientes.

OBJETIVO: Analisar o trofismo cutâneo de ratos nutridos e desnutridos por meio de dois modelos de desnutrição.

MÉTODOS: No Modelo Marasmo, utilizaram-se 60 ratos Wistar em controle dietético, dos quais 30 foram selecionados aleatoriamente para receber metade da dieta diária durante 60 dias. No Modelo Gelatina, empregaram-se 60 ratos, dos quais 30 receberam dieta associada a proteína de baixa qualidade (gelatina) durante 30 dias. Avaliou-se o estado nutricional dos animais por meio da massa corporal, dos sinais clínicos e da dosagem de albumina sérica. Após o período de desnutrição, fez-se a histologia da pele dos animais para análise da espessura da derme e epiderme com o *software Leica Application Suite*; nas lâminas coradas com tricrômio de Gomori, analisou-se a colágenese com o *software ImageJ*.

RESULTADOS: A massa corporal dos animais desnutridos pelo marasmo e gelatina foi significativamente menor ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) do que a dos grupos nutridos. Quanto à albumina sérica, não houve diferença entre os grupos nos dois modelos. Em relação à análise histológica da espessura da pele, os desnutridos apresentaram a derme significativamente menos espessa em comparação aos nutridos ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). No que respeita à colágenese, os grupos desnutridos apresentaram menores percentuais de colágeno em relação aos nutridos ($p < 0,0005$ e $p < 0,003$).

CONCLUSÕES: Os animais desnutridos pelos dois modelos apresentaram diminuição na espessura dérmica, confirmada histologicamente pelo menor percentual de colágeno, mostrando a influência negativa da desnutrição no trofismo cutâneo. **Palavras-chave:** Cicatrização; Colágeno; Gelatina; Marasmo nutricional; Modelos animais; Processamento de imagem assistida por computador

Received on 09.03.2010.

Approved by the Advisory Board and accepted for publication on 13.09.2010.

* Study conducted at the Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Conflict of interest: None / *Conflito de interesse: Nenhum*

Financial funding / *Suporte financeiro:* FAPESP/USP, CNPq, CAPES

¹ Master's degree. Currently participating in a postgraduate program in bioengineering at the Engineering School of São Carlos, School of Medicine of Ribeirão Preto and Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

² PhD. Professor, Clinical Nutrition Unit, Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

³ Master's degree. Currently undergoing postgraduate training at the Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

⁴ Post Doc. Professor, Dermatology Unit, Department of Clinical Medicine, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

©2011 by Anais Brasileiros de Dermatologia

INTRODUCTION

The skin is the largest organ in the human body and performs various important functions such as protecting against toxins and microorganisms present in the environment, preventing dehydration and participating in the immune system, in addition to its sensorial and healing properties.¹⁻³ However, to maintain its structure and function, adequate levels of nutrients such as proteins, carbohydrates, vitamins and minerals are required.⁴⁻⁶

Malnutrition may be described as a deficit of energy, protein and/or any other specific nutrient that leads to a measurable alteration in body function and that is associated with increasing the severity of a disease. It may be reversed with adequate nutritional support.⁷ It is highly prevalent in developing countries and is generally associated with socioeconomic and educational problems as well as with issues related to health and basic sanitation.⁸ Extreme cases of nutritional imbalance such as hunger and malnutrition induce a series of biochemical and organic changes in the individual such as protein, carbohydrate and lipid metabolism disorders, leading to a state of malnutrition either as the result of poor diet or induced by situations of stress that alter the protein requirements of individuals and what they need to compose amino acids.⁹

Proteins are macromolecules that are important to the body, since, in addition to their structural functions, they act as biological catalyzers and hormones, and also participate in the immune system, regulate cell development and participate in the transport of various substances. When proteins fail to play their structural and enzymatic role, a state of metabolic imbalance sets in and anemia, hypovitaminosis and protein-energy malnutrition may develop in the individual, this latter condition being one of the foremost social problems prevalent in Brazil.¹⁰

Protein-energy malnutrition (PEM) results from inadequate diet and is characterized by energy deficiency due to a reduction in the intake of all macronutrients and often many micronutrients. Clinically, PEM is classified into three major syndromes: marasmus, kwashiorkor or marasmic kwashiorkor, a combination of the two. Marasmus is the predominant form of PEM in most developing countries and may affect all age-groups. It occurs when energy intake is insufficient to satisfy the body's demands, causing the body to begin using its own stores of energy in the form of glycogen, skeletal muscles and, finally, the triglycerides located in the adipose tissue.¹¹ Consequently, the individual suffers a chronic reduction in weight due to loss of muscle mass and body fat, stunted growth and muscle atrophy, mental alertness being typically retained. Serum albumin levels remain practically

unchanged, with decreases only being detected at a later stage.^{4, 6-8, 12}

In addition to this type of malnutrition, another type may be triggered when the dietary intake of specific nutrients such as protein is insufficient or when intake is based on poor quality protein such as gelatin. Gelatin is a denatured collagen, the amino acid composition of which consists of a high concentration of glycine, proline and hydroxyproline associated with a low or negligible concentration of tyrosine, tryptophane, isoleucine, cystine and histidine.¹³ A deficit of these essential amino acids causes protein depletion in animals, leading to growth stunting.¹⁴

PEM affects the skin, causing significant morphological and functional alterations and predisposing it to damage (ulceration) with a consequent difficulty in healing. Nevertheless, little is known with respect to the skin alterations triggered by the specific depletion of proteins such as that occurring following the ingestion of gelatin. Malnutrition results in changes in inflammatory reaction, immune function and tissue regeneration, leading to an increase in proinflammatory cytokines, a delay in the healing process and a greater risk of infection.^{2,6,12,15,16}

Frade et al. analyzed a sample of 124 patients in Juiz de Fora and surrounding region and found that leg ulcers represented a protracted, recurrent condition that is generally associated with other chronic illnesses, principally affecting the low-income elderly population.¹⁷ Within the present scenario of increased incidence and prevalence of generally malnourished patients with ulcers and the various therapeutic options available to accelerate the healing process, it has become important to standardize and obtain more information on the experimental models of malnutrition in order to evaluate the mechanisms involved in tissue repair and, consequently, to assess the safety and efficacy of these products.¹⁸

Therefore, the objective of this study was to analyze the changes that occur in the trophic skin of rats subjected to different forms of malnutrition such as that achieved with the experimental model of marasmus and with a normal protein diet associated with low quality protein (gelatin).

MATERIAL AND METHODS

This experimental, randomized controlled clinical trial involving two models of malnutrition was conducted in accordance with the ethical principles and guidelines for animal testing defined in the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The study was approved under protocol CETEA/FMRP #274/2005).

Experimental induction of malnutrition

a) Marasmus model

Sixty adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of 180.0 to 200.0 grams in weight, obtained from the animal laboratory of the Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (FMRP-USP), were fed rat chow *ad libitum* for three days in order to calculate mean daily calorie intake. The animals were then randomly assigned to receive rat chow *ad libitum* (well-nourished group) or half the daily ration (malnourished group) and were followed up for two months. The animals received water *ad libitum* and were kept in individual cages at a constant temperature of 22°C, with the relative humidity of the air around 60%, automatic air exhaustion and artificial light on a 12-hour dark/light schedule (lights on from 6 am to 6 pm).

b) Malnutrition model consisting of a normal protein diet associated with low quality protein (gelatin).

Sixty adult male Wistar rats were given a special diet supplied by the Nutrition Department of FMRP-USP. Thirty of these animals received a normal protein diet and the remaining 30 received a normal protein diet associated with gelatin (Table 1). All were followed up for one month. The animals were kept in individual cages under the same conditions as those used in the marasmus model.

Confirmation of malnutrition

In the marasmus model, three days after the animals had arrived at the laboratory, their nutritional status was evaluated according to their body mass measured using a calibrated digital scale and accor-

ding to serum albumin levels measured at the Nutrition Laboratory of FMRP-USP. These measurements were repeated on the 60th day of the experiment.

In the gelatin model, nutritional status was evaluated in the same way as in the marasmus model but measurements were taken on the 30th day of follow up in view of the rapidly deteriorating condition of the animals.

Sampling and histopathological analysis

In the marasmus and gelatin models, 10 animals were sacrificed in each group on the 60th and 30th days, respectively. Samples from the dorsal skin of the rats were taken by 8 mm punch biopsy and fixed in 4% buffered formalin. The histological slides were stained with hematoxylin-eosin to measure skin thickness and Gomori trichrome to analyze collagenesis.

Measuring epidermal and dermal thickness

A Leica[®]DM 4000B optic microscope was used to capture the histological images at a magnification of 400x. Five images of the epidermis were taken in sequence as far as the subcutaneous cellular tissue. These images were automatically grouped using the Photomerge function of the Adobe Photoshop CS4 software. Using the Leica Application Suite (LAS) software, the mounted image was calibrated from 242 pixels to 50 μ m. A line was then drawn from the granular layer of the epidermis to the transition with the dermis (epidermal thickness) and from this point to the transition of the dermis with the subcutaneous cellular tissue (dermal thickness). When this was complete, the software supplied the distance in μ m.

Analysis of collagenesis

The images of the histological slides stained with Gomori trichrome were captured using the same microscope at a magnification of 100x. The standard 500 x 100 pixel region of interest (ROI) was defined and 10 photographs were taken of each sample from each group using the LAS software. Later, the images were analyzed using the color deconvolution plugin function of the ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), which supplies the percentage of blue staining (collagen) in each ROI.¹⁸⁻²²

Statistical analysis

The measurements of body mass, serum albumin levels, skin thickness and collagenesis were analyzed using Student's t-test and the Mann-Whitney test for the comparison of two non-parametric samples. P-values <0.05 were considered statistically significant.

TABLE 1: Nutritional composition of the experimental diets

Nutrients	Experimental Diets (g/1000g of chow)	
	Well-nourished	Malnourished
Protein (casein)	200	50
Gelatin	-	150
Lipid (soya oil)	70	70
Carbohydrate (corn starch)	532.5	532.5
Sucrose	100	100
Fiber (cellulose)	50	50
Mix minerals	35	35
Mix vitamins	10	10
Choline	2.5	2.5

RESULTS

The initial objective was to evaluate the sample power of 30 rats per group using body mass as the principal comparable variable in the study. Differences ≥ 44 grams were considered sufficient for a variance (σ^2) of 3650 grams, with an alpha of 5% and a β error of 20%.

In the marasmus model, body mass was lower in the animals in the malnourished group compared to the animals in the well-nourished group after 60 days of follow-up, with a difference of 294 grams between the measurements ($p < 0.0001$) (Figure 1A). Serum albumin levels remained similar in the two groups during the entire evaluation period (Figure 1B). In addition, it was found that the malnourished animals developed typical clinical signs of malnutrition such as decreased weight and growth, muscle atrophy, broken nails, hair loss, a state of mental alertness, intense agitation and hunger.

There was no statistically significant difference in mean epidermal thickness between the animals in the well-nourished group and those in the malnourished group. However, mean dermal thickness values were lower in the malnourished group compared to the well-nourished group and this difference was statistically significant ($p < 0.0001$) (Figures 2A and 2B). Figures 2C and 2D show the histological evidence of this difference in dermal thickness between the well-nourished and malnourished groups.

The collagen percentage, evaluated by analyzing the images of slides stained with Gomori trichrome stain at 60 days of follow-up, was found to be lower in the malnourished group compared to the well-nourished group ($p < 0.0005$) (Figure 3A). In the qualitative histological analysis, collagen was denser and patterns were more organized in the animals of

the well-nourished group compared to those of the malnourished group in which collagen was significantly looser (Figures 3B and 3C).

In the gelatin model of malnutrition, the sample power of 30 rats per group was established by a difference in mean body mass ≥ 25 grams for a variance (σ^2) of 657 grams, an alpha of 5% and a β error of 20%, which was confirmed by the difference of 116.8 grams found between the two groups. The malnourished animals experienced a rapid loss of body mass as shown by the significant difference found between the two groups on the 30th day of follow-up ($p < 0.0001$) (Figure 4A). Serum albumin levels were similar in the two groups at the end of the follow-up period (Figure 4B). The malnourished animals in the gelatin group experienced weight loss and stunted growth; their skin was thinner and more fragile; they were lethargic and experienced hair loss.

After a 30-day period, mean epidermal thickness in the well-nourished group was statistically similar to that of the animals in the malnourished group; however, dermal thickness was significantly lower in the malnourished group compared to the well-nourished group ($p < 0.0001$) (Figures 5A and 5B). Figures 5C and 5D show this difference in dermal thickness between the two groups from a histological point of view.

The percentage of collagen was higher in the group of well-nourished animals and this difference was statistically significant ($p < 0.003$) (Figure 6A). In the qualitative histological analysis, the area of collagen was better organized in the well-nourished group compared to the malnourished group (Figures 6B and 6C).

FIGURE 1: Distribution of: A, body mass (g) and B, serum albumin levels (g/dl) in the rats in the well-nourished and malnourished groups after 60 days of follow-up

FIGURE 2: Distribution of: A. epidermal thickness (μm) and B. dermal thickness in the well-nourished and malnourished groups after 60 days of follow-up. Photomicrography (hematoxylin-eosin) of skin samples from C. the well-nourished and D. malnourished groups

DISCUSSION

In the marasmus model, the protein-energy malnutrition model was used to evaluate the effects of malnutrition on the skin tissue of Wistar rats. In agreement with reports published in the literature, the experimental induction of marasmus in rats was confirmed by their weight and by the clinical signs presented by the animals.^{2,6,8,11,12} With respect to serum albumin levels, the results were similar in the well-nourished and malnourished groups after 60

days of follow-up, possibly due to the slow, belated reduction in albumin levels in marasmus.^{2,6}

Similar results were found with the gelatin model in which a diet containing low quality protein was used. Gelatin has an amino acid score of zero, meaning that tryptophan is absent in the protein; therefore its conversion to niacin is reduced, leading to growth stunting.^{23,24} In addition to a total lack of tryptophan, gelatin contains hydroxyproline and glycine, amino acids that also lead to growth stunting.

Figure 3: A. Distribution of the percentage of areas of collagen in the well-nourished and malnourished groups after 60 days of follow-up. Photomicrography of the slides stained by Gomori trichrome, magnification 100x, showing B. dense collagen in the well-nourished group; C. loose collagen with the presence of artifactual spaces in the samples from the malnourished group

FIGURE 4: Distribution of: A. body mass (grams) and B. serum albumin levels (g/dl) of the rats in the well-nourished and malnourished groups after 30 days of follow-up

²⁵ The malnutrition induced in the rats was confirmed by their excessive weight loss and consequent growth deficit and by the clinical signs shown by the animals. Serum albumin levels were similar in the two groups during follow-up, probably due to the lack of tryptophan in gelatin, leading to a suppression of niacin, with the tryptophan that is present in the body then being used to synthesize more important endogenous proteins, such as serum proteins, in order to maintain normal levels.²⁶

With respect to the histological analysis, a reduction in skin trophism (dermal thickness) occurred in the animals in the malnourished groups compared to the well-nourished groups in both models.

This fact was confirmed histologically by the lower percentage of collagen per skin area in the malnourished groups. Collagen is the major structural protein present in human beings, constituting three-quarters of the proteins present in skin. It is closely associated with the tensile strength and flexibility of skin and is important in the healing process. Nevertheless, during the malnutrition process, collagen deposition falls, compromising the function of collagen in healing the skin.^{15,26,27}

The results shown in the two models of malnutrition were similar irrespective of the model used, showing the negative effect of malnutrition on skin trophism in these animals, an effect that was confirmed

FIGURE 5: Distribution of: A. epidermal and B. dermal thickness (μm) in the well-nourished and malnourished groups after 30 days of follow-up. Photomicrography (hematoxylin-eosin) of skin samples from the C. well-nourished and D. malnourished groups

FIGURE 6: Distribution of: A. the areas of collagen in the well-nourished and malnourished groups after 30 days of follow-up. Photomicrography of slides stained by Gomori trichrome (magnification 100x) showing B. dense collagen in the animals of the well-nourished group and C. loose collagen with the presence of artifactual spaces in the slides of the animals in the malnourished group

med histologically by the reduction in dermal thickness and consequent decrease in the percentage of collagen, which may result in delays in the skin healing process, as has been already described by various authors.^{6,11,14,15,26,27}

CONCLUSIONS

Histological alterations in dermal thickness and in collagenesis were found in the malnourished animals in both experimental models, confirming the negative effect of malnutrition on skin trophism in rats and characterizing them as important models for further studies into the healing process. □

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Ms. Marilena Heredia for technical support and to FAEPA-HC-FMRP/USP and CNPq for financial support.

REFERENCES

- Clark RAF, Gosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1018-29.
- Waldrop J, Doughty D. Wound healing physiology. In: Baranoski S, Ayello EA. *Wound Care Essentials*. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 17-27.
- Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*. 2009;84:257-62.
- Thomas DR. Improve outcome of pressure ulcers with nutritional intervention: a review of the evidence. *Nutrition*. 2001;17:121-5.
- Russell L. The importance of patients' nutritional status in wound healing. *Br J Nurs*. 2001;10:S42-S49.
- Mechanick JL. Practical aspects of nutrition for wound healing patients. *Am J Surg*. 2004;188(1A Suppl):52-6.
- Allison SP. Malnutrition, disease, and outcome. *Nutrition*. 2000;16:590-3.
- Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ*. 2005;173:279-86.
- FAO/WHO/UNU. Necessidade de energia y proteína. Série de Informes Técnicos da FAO/WHO/UNU, nº 724. Organización Mundial de la Saúde. Ginebra: Switzerland, 1985.
- Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistela V. Effects of early malnutrition and nutrition rehabilitation in rats. *J. Pediatr*. 2002;77:39-44.
- International Food Biotechnology Committee - ILSI. Appendix 4: Protein-energy malnutrition. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2008;7:111-2.
- Pinheiro AL, Meireles GC, Carvalho CM, de Barros Vieira AL, dos Santos JN, Ramalho LM. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:616-24.
- Neuman RE. The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources. *Arch Biochem*. 1949;24:289-98.
- Sanahuja JC, Harper AE. Amino acid balance and imbalance XII. Effect of amino acid imbalance on self-selection of diet by the rat. *J. Nutr*. 1963;81:363-71.
- Van Den Broeck J, Eeckels R, Vuylsteke J. Influence of nutritional status on child mortality in rural Zaire. *Lancet*. 1993;341:1491-5.
- Mackay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev*. 2003;8:359-77.
- Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, Soares SC, Ribeiro WS, Santos SV, et al. Úlcera de perna: Um estudo de caso em Juiz de Fora - MG (Brasil) e região. *An Bras Dermatol*. 2005;80:41-6.
- Minatel DG, Enwemeka CS, França SC, Frade MAC. Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *An Bras Dermatol*. 2009;84:279-83.
- Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinielli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using Image. *J. Ultrastruct. Pathol*. 2007;31:401-7.
- Caetano KS, Frade MA, Minatel DG, Santana LA, Enwemeka CS. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomed. Laser Surg*. 2009;27:111-8.
- Caetano KS, Minatel DG, Santana LA, Enwemeka CS, Frade MA. Eficácia da fototerapia associada à sulfadiazina de prata no tratamento de úlceras venosas crônicas. *Fisioter Bras*. 2009;10:388-94.
- Minatel DG, França SC, Enwemeka CS, Frade MA. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers Surg Med*. 2009;41:433-41.
- Henderson LM, Koeppel OJ, Zimmermann HH. Niacin-tryptophan deficiency resulting from amino acid imbalance in non-casein diets. *J Biol Chem*. 1953;201:697-706.
- Ramarao PB, Norton HW, Johnson BC. The amino acids composition and nutritive value of proteins. V. amino acid requirements as a pattern for protein evaluation. *J Nutr*. 1964;82:88-92.
- Savage JR, Harper AE. Influence of gelatin on growth and liver pyridine nucleotide concentration of the rat. *J Nutr*. 1964;83:158-64.
- Patel GK. The role of nutrition in the management of lower extremity wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005;4:12-22.
- Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(Suppl 7):1e-S-32e-S.

MAILING ADDRESS / ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 Marco Andrey Cipriani Frade
 Divisão de Dermatologia do Departamento de
 Clínica Médica da Faculdade de Medicina de
 Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
 Avenida dos Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre
 14049-900 Ribeirão Preto - São Paulo - SP, Brazil
 E-mail: mandrey@fmrp.usp.br

How to cite this article/Como citar este artigo: Leite SN, Jordão AA, Andrade TAM, Masson DS, Frade MAC. Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):681-8.

APÊNDICE B – Email de aprovação do artigo intitulado 'Fototerapia acelera a cicatrização de úlceras cutâneas em ratos desnutridos' pelos Anais Brasileiros de Dermatologia, 2014.

Fwd: Artigo Aprovado SGP/ ABD

Marco Andrey Cipriani Frade

18 de jan (6 dias atrás)

para mim

----- Mensagem encaminhada -----
De: <sgpabd@sgponline.com.br>
Data: 16/01/2014 13:26
Assunto: Artigo Aprovado SGP/ ABD
Para: <mandrey@fmrp.usp.br>
Cc:

Anais Brasileiros de Dermatologia
(Brazilian Annals of Dermatology)

Av. Rio Branco, 39 17. and.
Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP 20090-003 Tel./Fax: [+55 21 2253-6747](tel:+552122536747)

Rio de Janeiro, quinta-feira, 16 de janeiro de 2014

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE

Referente ao código de fluxo: 3356
Seção: Investigação

Temos o prazer de informar que o manuscrito Fototerapia acelera a cicatrização de úlceras cutâneas em ratos desnutridos foi aprovado pelo Conselho Editorial dos Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology) e será publicado em breve. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Obrigado por submeter seu trabalho à Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology).

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Zelda".

Dra. Izelda Maria Carvalho Costa
Editora Científica dos Anais Brasileiros de Dermatologia

Dr. Andrelou Fralete A. Vallarelli
Editor Associado

Dr. Renan Rangel Bonamigo
Editor Associado

Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis
Editor Associado

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética em Experimentação Animal
(16) 3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 205/2011, sobre o projeto intitulado *"Efeitos da fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos submetidos à dieta hiperlipídica para indução de obesidade"*, sob a responsabilidade do Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO em reunião de 26 de março de 2012.

(We certify that the protocol n° 205/2011, about "Effects of the phototherapy in the wound healing in rats subjected to high-fat diet to induce obesity", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 01/26/2012.

Ribeirão Preto, 26 de março de 2012.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Laudo de calibração do *laser Flash Lase III*

São Carlos, 05 de Dezembro de 2012

Laudo Técnico

Modelo do Equipamento: Flash Lase III

Número de série: 1960

Os testes mencionados neste laudo possuem a finalidade de atender aos rigorosos padrões de qualidade exigidos pela empresa D.M.C. Equipamentos.

Aferição de Potência:

Estabelece o comparativo entre as Potências determinadas e as Potências medidas.

Temperatura Ambiente: 24,6° C

Medidor Laser utilizado: Coherent LM 10-HTD

Tipo de Laser	λ (nm)	Meio Ativo	Potência Referida	Potência Medida
Vermelho	660	IN Ga AL P	100 mW	102 mW
Infravermelho	908	As Ga Al	100 mW	101 mW
Tipo de Condução Óptica	Abertura Numérica	Comprimento	Seção Transversal	
Fibra Óptica de Silica	0,48	10 cm	1 mm	

Avaliação Técnica:

A calibração atende a todos os requisitos do Controle de Qualidade da empresa. Dados referentes a calibração realizada na data de 30/08/2011.

Abelardo Oppermann
Técnico responsável pela calibração