

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GISLAINE MARQUES FARIA

Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC)

Ribeirão Preto

2021

GISLAINE MARQUES FARIA

**Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC)**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Coorientadora: Dra. Natália Aparecida de Paula

Ribeirão Preto

2021

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

#### FICHA CATALOGRÁFICA

FARIA, Gislaine Marques

Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC). Ribeirão Preto, 2021.95p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Clínica Médica: Investigação Biomédica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani

Coorientadora: Paula, Natália Aparecida de

1. Cicatrização 2. Fototerapia 3. hOSEC 4. Estresse Oxidativo 5. Biologia Molecular

Nome: FARIA, Gislaine Marques

Título: Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico, em especial, ao meu pai **Emílio** e a minha mãe **Célia** (in memoriam), por sempre acreditarem e não medirem esforços pra chegar onde hoje estou. Em muito dos momentos pensei não ser capaz, minha fé se abalou, mas vocês estavam lá, sempre firmes, de sorriso largo e braços abertos, com uma palavra de carinho e amor para que eu não desistisse dos meus sonhos. Minha eterna gratidão, aos meus maiores exemplos de vida.*

*As minhas irmãs **Solange** e **Letícia**, fonte de todo meu orgulho e admiração. Obrigada por todo amor, paciência, companheirismo e momentos compartilhados. Sou eternamente grata, por sempre me apoiarem em minhas decisões e mais ainda por me incentivarem a seguir em frente, se hoje estou conquistando mais um sonho, eu devo isso a vocês, que não mediram esforços para me impulsionar a seguir em frente e concretizá-los.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por me mostrar sempre os caminhos a seguir. Sei que tudo é no seu tempo e que as melhores coisas já foram reservadas. Sei também que há um propósito em nossas vidas e permaneço nele com confiança e fé. Obrigada por não permitir que eu desista dos meus sonhos e por providenciar tudo no momento certo.

Ao meu pai *Emílio Spineli de Faria* e minha mãe *Célia Maria Marques Faria* fonte de todo meu amor, respeito e admiração. Palavras me faltam pra expressar tudo que vocês representam pra mim. Meu porto seguro nas horas incertas, amor incondicional. Dedico a cada um essa conquista, pois sem vocês eu nada seria capaz.

As minhas irmãs *Solange Marques Faria* e *Letícia Marques Faria* por se fazerem tão presentes em todos os momentos da minha vida, sendo meu ombro amigo, meu refúgio. Que eu possa retribuir a cada uma tudo que vocês têm feito por mim. Amo muito vocês

Ao Prof. Dr. *Marco Andrey Cipriani Frade* por aceitar me orientar, depositando toda sua confiança em mim, mesmo sem antes me conhecer. Obrigada pelas trocas de aprendizado e por cada entusiasmo com os resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. *Saulo Nani Leite* que desde a graduação foi peça chave na minha formação, por acreditar no meu potencial, me incentivar a sempre buscar por mais e depositar toda sua confiança. Sua eterna gratidão.

Ao doutorando e amigo *Marcel Nani Leite*, um anjo em forma de pessoa. Devo a você grande parte de todo esse resultado. Teve a paciência de me ensinar do zero tudo que coloquei em prática aqui, além dos incontáveis experimentos realizados com seu auxílio. Minha eterna gratidão, que você conquiste o mundo e seja muito feliz.

A minha co-orientadora e amiga *Natália Aparecida de Paula* que esteve disposta a compartilhar todo seu conhecimento comigo, foi fonte de paciência, cumplicidade e trouxe a tranquilidade nos momentos de desespero, obrigada por me salvar na hora dos “apuros”. Também devo esse resultado a você, que não mediu esforços pra abraçar minhas ideias.

A minha colega de profissão e amiga *Danielly Montana* que esteve em todos os momentos ao meu lado, sendo fonte de inspiração, força e confidente. Obrigada por tanta entrega e reciprocidade e por se fazer presente mesmo na distância.

A amiga e técnica *Maria Aparecida Nunes (Cici)* pelas incontáveis conversas, onde me tranquilizaram e me deram motivações para seguir em frente. Além das suas torcidas e vibrações com todos os passos ganhos na pesquisa.

A amiga *Márcia Lopes* que compartilhou dos mesmos momentos que eu, dos perrengues pra pegar o ônibus e pelo companheirismo nos experimentos que estenderam até a noite.

A minha colega de profissão e amiga *Thaís Carolina*, presente do Aprimoramento em Ortopedia e Traumatologia. Minha eterna gratidão por sempre me ouvir falar dos incontáveis

experimentos e suas dificuldades e me mostrar sempre o lado bom das coisas. Estarei sempre na torcida por você.

A todos os *pacientes* que contribuíram com a pesquisa e disponibilizaram as peles para que fosse possível a execução deste trabalho.

As instituições *CAPES/CNPQ e FAPESP* que contribuíram para a realização deste trabalho.

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

## RESUMO

FARIA, Gislaine Marques. Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC). 2021. 95p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Introdução:** As feridas cutâneas crônicas são problemas de saúde pública. A perda da solução de continuidade da pele pode acarretar desequilíbrio fisiológico no indivíduo e complicações, sendo necessária intervenção para acelerar o processo de cicatrização. A terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) é um recurso altamente estudado com a finalidade de compreender seus efeitos positivos ao organismo. O modelo ex vivo de pele humana (hOSEC) é capaz de manter em parte a complexidade do sistema de origem, com condições próximas a fisiologia normal da pele, tornando-se alvo de interesse para pesquisa alternativa ao uso de animais. **Objetivo:** Avaliar a eficácia da LLLT em úlceras cutâneas experimentais no modelo ex vivo de pele humana. **Métodos:** Pele oriunda de cirurgias de abdominoplastia foram utilizadas, sendo usados 2 punches: um de 10mm para os cortes dos explantes e outro de 3 mm para as úlceras. Aplicou-se laser de diferentes comprimentos de onda: 660 nm, 830 nm e a associação de 830 nm + 660 nm aplicados consecutivamente, na dose de 2J para os grupos 660 nm e 830 nm e 4J para o grupo 830 nm + 660 nm e comparou-se a um grupo não irradiado. As análises foram processadas por técnicas histopatológicas, bioquímicas (GSH, DPPH, MDA e FOX) e de biologia molecular (COL1A1, COL3A1, MMP-1 e CCND1), acompanhadas durante o período de cultivo de 6 dias. **Resultados:** Histologicamente o modelo ex vivo manteve sua estrutura durante todo o período de cultivo e observamos que alguns fragmentos apresentaram migração dos queratinócitos nas bordas das feridas, mas sem padrão específico em relação aos grupos de intervenção. Em relação ao estresse oxidativo e expressão gênica, no modelo e no período avaliado, não houve resultados significantes entre os grupos tratados e o não tratado. **Conclusão:** Os dados quantitativos dos experimentos não mostraram alteração significativa no processo de cicatrização em interação com a fototerapia, provavelmente pela diluição dos sinalizadores relativos ao tamanho da úlcera frente a todo o fragmento macerado. No entanto, o modelo ex vivo de pele humana (hOSEC) se confirmou como modelo experimental para avaliar o processo de cicatrização à histopatologia, mantendo a viabilidade celular em todos os grupos, mesmo permanecendo em cultura apenas pelo período de 6 dias, consolidando-se como promissor para estudos em fototerapia na cicatrização, mesmo com a falta de circulação e da influência da inflamação no modelo.

Palavras-chaves: Cicatrização; Fototerapia; hOSEC; Estresse Oxidativo; Biologia Molecular



## ABSTRACT

FARIA, Gislaine Marques. Influence of phototherapy on healing in the *ex vivo* model of human skin (hOSEC). 2021. 95p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Introduction:** Chronic skin wounds are public health problem. A loss of skin continuity solution for the skin can cause physiological imbalance in the individual and complications, what require interventions to accelerate the healing process. Low-intensity laser therapy (LLLT) is a resource widely studied for the purpose of applying its positive effects on the body. The *ex vivo* model of human skin (hOSEC) is capable of maintaining part of the complexity of the original system, with conditions closer to the normal physiology of the skin, becoming a source of interest for an alternative research to the use of animals.

**Aims:** This study aims to evaluate in *ex vivo* skin model the influence of LLLT on skin ulcers.

**Methods:** Human skin from abdominoplasty surgeries was cut with a 10-mm biopsy punch and with another punch a 3-mm ulcer was made in the center, maintained on culture plates during 6-day. Lasers of different wavelengths were applied: 660 nm, 830 nm and associated therapy (830 nm plus 660 nm consecutively), in the dose of 2J for the groups 660nm and 830 nm and 4J for the group 830 nm + 660 nm and compared to a non-irradiated group. The explants were analyzed by histopathological, biochemical (DPPH, GSH, FOX, MDA) and RT-PCR (COL1A1, COL3A1, MMP-1 and CCND1) techniques. **Results:** Histologically, the explants maintained its structure throughout the culture period. It was possible observed migration of keratinocytes at the edges of the wounds of some explants, but without specific pattern in relation to the intervention groups and the untreated. Regarding oxidative stress and gene expression, the model and in the period evaluated, there were no significant results between the treated and untreated groups. **Conclusion:** Quantitative data from the experiments did not show any significant change in the healing process in interaction with phototherapy, probably due to the dilution of the indicators relating to the minimum size of the ulcer in relation to the entire macerated fragment. However, the *ex vivo* model of human skin (hOSEC) was confirmed as an experimental model to assess the healing process through histopathology, maintaining cell viability in all groups, even if it remained in culture only for a period of 6 days, consolidating itself as promising for studies in healing phototherapy, even with the lack of circulation and the influence of inflammation in the model.

Keywords: Healing; Phototherapy; hOSEC; Oxidative stress; Molecular biology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camadas da pele: Esquema ilustrativo das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e seus respectivos componentes.....	19
Figura 2 - Morfologia dos queratinócitos: Esquema representativo das camadas de queratinócitos: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.....	20
Figura 3 - Montagem do experimento .....	41
Figura 4 - Placa de cultura.....	42
Figura 5 - Imagem dos explantes utilizados anteriormente pelo grupo de cicatrização.....	43
Figura 6 - Calibração do aparelho .....	44
Figura 7 - Suporte de apoio padronizado.....	45
Figura 8 - Linha do tempo indicando os dias de irradiação e a retirada dos fragmentos .....	46
Figura 9 - Modo de aplicação da fototerapia e da solução (DMEM+ 1/3 K-SFM) .....	47
Figura 10 - Microscópio com smarthphone acoplado .....	48
Figura 11 - Histomorfologia dos explantes .....	57
Figura 12 - Quantificação de GSH .....	58
Figura 13 - Quantificação de DPPH.....	59
Figura 14 - Quantificação de MDA.....	60
Figura 15 - Quantificação de FOX .....	61
Figura 16 - RNA total dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm.....	63
Figura 17 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo...	65
Figura 18 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2) .....	66
Figura 19 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4) .....	66
Figura 20 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6) .....	67
Figura 21- Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo..	68
Figura 22 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2) .....	69
Figura 23 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4) .....	69
Figura 24 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6) .....	70
Figura 25 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo .....	71
Figura 26 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2) .....	72
Figura 27 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4) .....	72

Figura 28 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6) .....73

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre os modelos: ex vivo de pele humana hOSEC e de pele reconstruída em 3D em estudos de moléculas / produtos para efeito de ação da pele. ....	31
Tabela 2 - Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação de cDNA.....	53
Tabela 3 - Protocolo de ciclagem para cada par de <i>primer</i> .....	54
Tabela 4 - Razão entre as absorbâncias 260/ 280 das amostras de RNA .....	62

## LISTA DE SIGLAS

$\alpha$ - SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso
5 ALA	Ácido 5 aminolevulínico
ACTB	$\beta$ - actina
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BHT	Butil-hidroxitolueno
CCND-1	Ciclina- D1
cDNA	Síntese de DNA complementar
CD31	Marcador de molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas
CDKN2A/ p16INK	Inibidor da quinase dependente de ciclina 2A
CK 14	Citoqueratina 14
CO <sup>2</sup>	Gás carbônico
COL1A1	Colágeno tipo I
COL3A1	Colágeno tipo III
COX	Citocromo C oxidase
CT	Cycle Threshold
DCF	2', 7'-Diclorodi-hidrofluorescina
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DPPH	Radical 2,2 Difenil- 1-picrilhidrazil
DTNB	L ácido 2,2' - dinitro 5-5' ditiotibenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos

Fe <sup>+2</sup>	Íon ferroso
Fe <sup>+3</sup>	Íon férrico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOX	Oxidação do ferro em xilenol laranja
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hospital das Clínicas
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
hOSEC	Cultura organotípica de explante de pele humana
IL <sub>1</sub>	Interleucina 1
IL <sub>2</sub>	Interleucina 2
INF	Interferon
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
J	Joule
Ki67	Marcador de proliferação ki-67
K- SFM	Keratynocyte serum free medium
KGF	Fatores de crescimento de queratinócitos
LASER	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LDL	Lactato desidrogenase
LED	Diodo emissor de luz
LLLT	Terapia a laser de baixa intensidade
MALA	Metil aminolevulínato
MDA	Melondialdeído
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama

mL	Mililitro
MMII	Membros inferiores
MMPs	Metaloproteinase
MMP1,3 e 19	Metaloproteinase, 1, 3 e 19
MTCO1	Citocromo C oxidase 1
mw	MiliWatts
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio
Ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
OS	Estresse oxidativo
PBM	Fotobiomodulação
PBS	Tampão- fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PVC	Policloreto de vinila
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPL32	Proteína ribossomal L32 60S
qPCR	PCR quantitativa
SBF	Soro bovino Fetal
SOO	Óleo essencial de <i>Salvia Officinalis</i>
T4	L- Tiroxina
TaC	Capacidade Antioxidante Total
TCA	Ácido Tricloroacético
TFD	Terapia fotodinâmica
TGF-β	Fator de crescimento beta

THs	Hormônios tireoidianos
TM	Temperatura de Melting
TMP	Tetrametoxipropano
TMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNF- $\alpha$	Fator de crescimento alfa
TRIS	Hidroximetil
$\mu$ L	Microlitro
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WHOC	Cultura de órgãos de cicatrização de feridas
WST-1	kit de proliferação celular WST-1



## SUMÁRIO

1.1 FISILOGIA DA PELE.....	18
1.1.1 Epiderme .....	19
1.1.2 Derme .....	21
1.1.3 Hipoderme.....	22
1.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO .....	22
1.3 FERIDAS CUTÂNEAS .....	25
1.4 MODELOS PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS .....	28
1.5 TERAPIAS UTILIZADAS EM MODELO EX VIVO .....	32
1.6 FOTOTERAPIA .....	34
1.6.1 LASER e LED's.....	35
1.6.2 Mecanismos moleculares após a fotobiomodulação .....	36
2 OBJETIVO .....	39
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	40
3.2 CULTURA ORGANOTÍPICA DE EXPLANTE DE PELE HUMANA (hOSEC DO INGLÊS – HUMAN ORGANOTYPIC SKIN EXPLANT CULTURE) .....	40
3.3 PADRONIZAÇÃO DO MODELO hOSEC.....	42
3.3.1 Definição dos grupos.....	44
3.4 APARELHO DE FOTOTERAPIA E MODO DE APLICAÇÃO.....	44
3.5 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO.....	47
3.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).....	47
3.6 ESTUDO BIOQUÍMICO .....	48
3.6.1 Glutathiona Reduzida - GSH.....	49
3.6.2 Radical2, 2 difenil - 1- picrilhidrazil - DPPH .....	49
3.6.3 Malondialdeído - MDA.....	49
3.6.4 Hidroperóxidos - FOX .....	50
3.6.5 Proteínas Totais .....	51
3.7 ESTUDO MOLECULAR.....	51
3.7.1 Extração de RNA total dos explantes.....	51
3.7.2 Quantificação e avaliação de integridade do RNA .....	52

3.7.3 Tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	52
3.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	53
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS .....	56
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PELE DOS DOADORES .....	56
4.2 ANÁLISE DOS EXPLANTES DE PELE.....	56
4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA .....	57
4.3.1 Defesas Antioxidantes.....	57
4.3.1.1 Glutathiona Reduzida - GSH .....	57
4.3.1.2 Radical 2,2 difenil- 1- picrilhidrazil – DPPH .....	58
4.3.2 Estresse Oxidativo.....	59
4.3.2.1 Malondialdeído - MDA .....	59
4.3.2.2 Hidroperóxidos - FOX .....	60
4.4 ANÁLISE MOLECULAR .....	61
4.4.1 RNA .....	61
4.4.2 Expressão gênica .....	63
5 DISCUSSÃO .....	74
6 CONCLUSÃO.....	84
7 REFERÊNCIAS .....	85
ANEXOS .....	94
ANEXO 1 - Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisa em seres humanos do HCRP e FMRP-USP.....	94
ANEXO 2 - Consentimento e concordância do Setor de Cirurgia Plástica.....	95

# 1 INTRODUÇÃO

“Estar decidido, acima de qualquer coisa, é o segredo do êxito”.  
Henry Ford

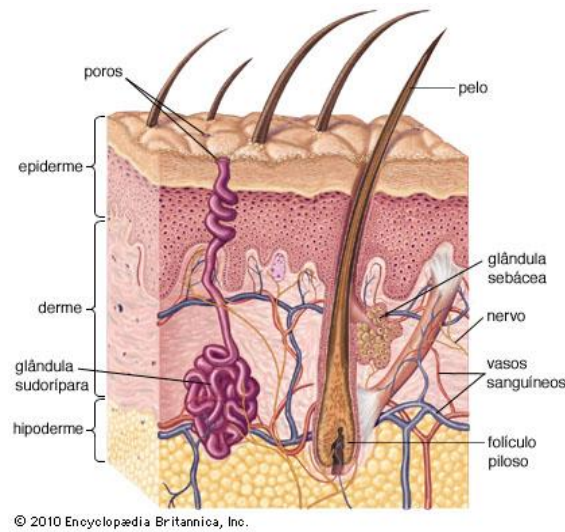
## 1.1 FISIOLÓGIADA PELE

A pele, também denominada sistema tegumentar, é considerado o maior órgão do corpo humano e é responsável por desempenhar inúmeras funções no organismo, tais como: proteção mecânica contra traumas externos, barreira contra microrganismos e toxinas, participação nos sistemas: imunológico e termorregulador, além de importante papel nas funções metabólicas. Assim, as funções desempenhadas são consideradas vitais para manter a fisiologia normal da pele e conseqüentemente evitarem danos ao organismo (COALSON et al, 2019; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Ademais, a pele é um órgão altamente estruturado, constituído por três camadas distintas: **epiderme, derme e hipoderme** (Figura 1), compostas por células específicas e importantes para o tecido e suas funções fisiológicas.

A junção da epiderme com a derme é irregular e possui projeções denominadas papilas dérmicas que se encaixam em reentrâncias da epiderme e aumentam a coesão entre essas duas camadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Essa interface derme-epiderme atua como suporte para a epiderme, estabelecendo a polaridade celular, ou seja, troca de células e fluidos e participam na organização e direção dos queratinócitos na camada basal, principais componentes da junção dermo-epidérmica (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 1 - Camadas da pele: Esquema ilustrativo das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e seus respectivos componentes.



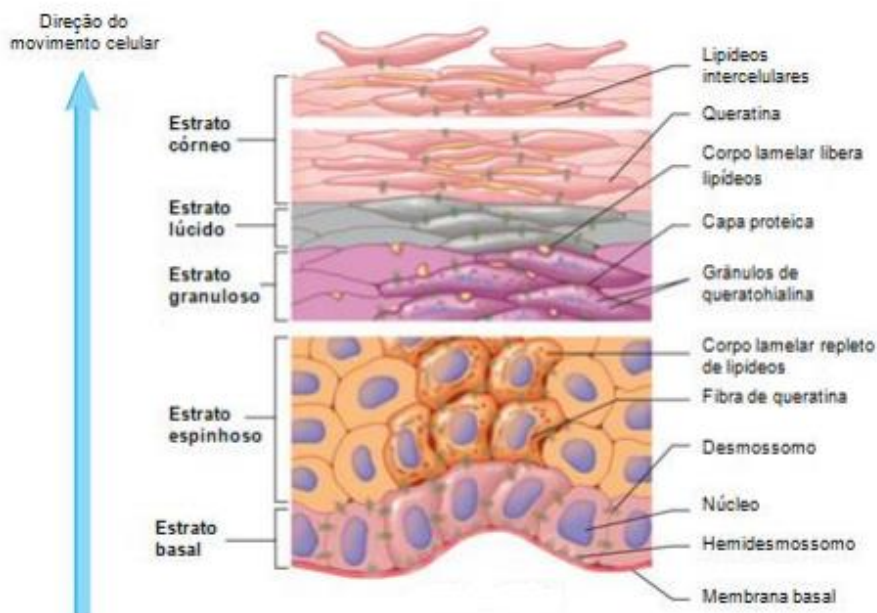
Fonte: <https://escola.britannica.com.br/artigo/pele/482514>

### 1.1.1 Epiderme

A parte mais externa da pele é a epiderme, onde há uma série de tipos celulares. Essa camada é composta especialmente por queratinócitos, que são células de origem ectodérmica, responsáveis pela produção de queratina, principal proteína extracelular da epiderme. Os melanócitos, por sua vez, são células que produzem a melanina, pigmento que dá cor à pele e atua na proteção contra os raios ultravioletas e estão presentes na junção da derme com a epiderme entre os queratinócitos da camada basal. Células de Merkel localizadas próximo das terminações nervosas, as quais são mecanorreceptores responsáveis pela sensação do tato. E as células de Langerhans, abundantes nesta camada, encarregado pela resposta imunológica atuando na proteção da pele, com função apresentadora de antígeno e ativação dos linfócitos T (COALSON et al, 2019, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Histologicamente, a epiderme é um epitélio escamoso estratificado e queratinizado apoiado na membrana basal, que a separa da derme, constituída por cinco camadas de acordo com a morfologia dos queratinócitos e dispostas na seguinte ordem: **basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea** (Figura 2) (ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005).

Figura 2 - Morfologia dos queratinócitos: Esquema representativo das camadas de queratinócitos: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea



Fonte: Seeley; Stephens & Tate, 2011

A **camada basal ou estrato germinativo**, considerada a camada mais profunda da epiderme, constituída de uma única camada de queratinócitos com formato cúbico, que se dividem de forma ativa e repõe as células de todas as camadas mais superficiais da epiderme. Essas células se movem em direção as outras camadas e alcançam a camada córnea em um período de aproximadamente 35 dias. (COALSON et al, 2019; ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005). Portanto, as células basais sofrem ciclos de proliferação contínuos que resulta na renovação epitelial do estrato córneo, a camada mais externa da epiderme. Em adição, a espessura da epiderme é mantida constantemente pela apoptose e pelo controle mitótico (COALSON et al, 2019; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Localizada logo acima da camada basal, a **camada espinhosa** é a camada de maior espessura, suas células são poligonais e promovem a adesão intercelular, junto com a camada basal é responsável pela constante renovação da epiderme. Sobre a camada espinhosa, está a **camada granulosa**, nela há células achatadas com abundantes proteínas intracelulares. Estas células produzem grânulos de queratina e de substância fosfolipídica, seu principal papel é

proporcionar uma forte adesão mecânica por meio dos desmossomas, aumentando desse modo a integridade estrutural da pele. Em contrapartida, a **camada lúcida** está presente somente em áreas onde a epiderme é mais espessa (regiões palmares e plantares), onde há uma camada de células achatadas as quais já sofreram degeneração dos núcleos. Por sua vez, a **camada córnea** é a camada mais superficial da epiderme, composta de células anucleadas mortas e apresenta-se com uma densa matriz extracelular de queratina. Essa camada mais superficial é constantemente removida da superfície corporal, e atua como uma barreira mecânica, protegendo as demais camadas do epitélio (COALSON et al, 2019; EDWARDS, 2005).

Em síntese, o tecido se regenera de forma constante, sendo necessário que a epiderme mantenha-se com um determinado número de células, capaz de regular as interações e/ou junções entre as células epidérmicas ao longo da vida, por outro lado, a manutenção da espessura epidérmica depende de fatores intrínsecos das células epidérmicas, como a capacidade de sofrer apoptose, uma morte celular programada que não gera lesão às células vizinhas, um processo biológico regulado e importante para manutenção da fisiologia do tecido (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

### 1.1.2 Derme

A derme está localizada logo abaixo da epiderme, sendo constituída por um sistema integrado de tecido conjuntivo de origem mesenquimal, vascularizada, responsável por apoiar a epiderme e unir-se a hipoderme. Especialmente composta por fibras de colágeno e fibras de elastina sintetizada por fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas. Nessa região também estão presentes os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005; HABIF, 1996).

Estruturalmente a derme é constituída por duas camadas distintas. A camada papilar ou superior está localizada próxima a epiderme, formando as papilas dérmicas, é constituída por tecido conjuntivo frouxo, composta de fibras colágenas dispostas aleatoriamente. A camada reticular ou inferior é mais espessa comparada a papilar, é composta de tecido conjuntivo denso que se estende da base da camada papilar a hipoderme. Essa camada é constituída especialmente por fibras de colágeno espessas e dispostas paralelamente à superfície da pele (HABIF, 1996).

O colágeno representa cerca de 70% do peso seco da pele, o principal constituinte da derme é o colágeno tipo I, principal proteína extracelular predominante nesta camada,

sintetizada pelos fibroblastos. A camada da derme é responsável por muitas das propriedades físicas da pele, como exemplo, resistência à tração, elasticidade e flexibilidade (COALSON et al, 2019; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; JAMES et al, 2006).

### 1.1.3 Hipoderme

A hipoderme também conhecida por tecido celular subcutâneo é constituída de tecido conjuntivo frouxo. Nessa região estão localizados os adipócitos responsáveis pela reserva energética (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Dependendo da região do organismo e o grau de nutrição do indivíduo, a camada de tecido adiposo poderá ser variável. A função dessa camada está na prevenção da perda de calor agindo como isolante térmico, bem como na proteção de órgãos internos (EDWARDS, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

## 1.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

O processo cicatricial é um evento biológico complexo, dinâmico e multifatorial, no qual, envolve eventos sequenciais e sobrepostos com participação de elementos celulares ou extracelulares específicos que objetivam restaurar os tecidos lesionados (COALSON et al, 2019; WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017; CARDOSO et al, 2011; VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009; GURTNER et al, 2008).

As fases de cicatrização como descrito na literatura são: **injúria tecidual, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual**. Entretanto, alguns autores descrevem o processo apenas em 4 ou 3 fases (WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017; GURTNER et al, 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; BARONOSKI; AYELLO, 2004).

A **injúria tecidual** é caracterizada por injúria microvascular e extravasamento de sangue para a ferida, preenchendo a área lesada com plasma e elementos celulares (plaquetas). Por consequência, a permeabilidade vascular é aumentada para que permita que células de defesa (macrófagos, neutrófilos, linfócitos), bem como, liberação de proteínas plasmáticas (fibronectina e fibrogênio) migrem ao sítio da lesão (BEANNES et al, 2003; KARUKONDA et al, 2000).

A perda da integridade estrutural inicia a cascata de **coagulação**, levando a formação de coágulo de fibrina e agregação plaquetária. O coágulo compreende fibrina, fibronectina,

vitronectina, trombospondinas e fator de Von Willebrand e fornece a matriz provisória para a migração celular. Já as plaquetas presas ao coágulo são consideradas essências para hemostasia e a resposta inflamatória normal. A interação de citocinas e fatores liberados pelas células neste tecido lesado ajudam a estabilizar a ferida e agem para controlar o sangramento e limitar a extensão da lesão (COALSON et al, 2019; BEANNES et al, 2003; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

O início da **fase inflamatória** é marcado especialmente pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos, a resposta celular é inicialmente dominada por neutrófilos, que mais tardiamente são substituídos por macrófagos. Assim, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas após a formação do coágulo, sendo os responsáveis por iniciar o desbridamento do tecido lesado e fagocitar os agentes infecciosos liberando várias substâncias antimicrobianas (espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos catiônicos, eicosanóides) e proteinases (elastases, catepsina G, proteinase 3), ocasionando “limpeza” no local da ferida. Entretanto, os neutrófilos têm uma meia vida curta, por isso, após 48h as células predominantes na região lesionada são os monócitos, que irão se diferenciar em macrófagos, os quais são considerados a célula regulatória mais importante da resposta inflamatória.

Os macrófagos irão continuar o processo de fagocitar e destruir os organismos patogênicos, além de, remover os *debris* celulares e sintetizar as citocinas, as quais contribuem para angiogênese e na formação do tecido de granulação. Além disso, os macrófagos liberam os fatores quimiotáticos responsáveis pela quimiotaxia dos fibroblastos para o sítio da lesão. As citocinas desta fase são derivadas principalmente destes macrófagos como: PDGF, TNF- $\alpha$ , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interferon (INF) e interleucinas 1 e 2 (IL<sub>1</sub> e IL<sub>2</sub>) (COALSON et al, 2019; LEITE et al, 2015; KARUKONDA et al, 2000).

Os macrófagos têm um papel fundamental em todas as fases do processo de cicatrização, sendo considerado um marcador da fase inflamatória final e transição para o início da fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; DIEGELMANN; EVANS, 2004).

A **fase proliferativa** é marcada por intensa atividade celular e migração de diferentes tipos celulares, com a finalidade de restabelecer a integridade da epiderme e derme, essa fase inicia-se geralmente três dias após uma lesão. Nesta etapa, os eventos que se destacam são a formação de tecido de granulação, angiogênese, reepitelização e deposição de colágeno.

A formação do tecido de granulação, nome recebido devido a sua aparência granular, ocorre através de dois mecanismos: formação de novos vasos (angiogênese) e pela proliferação



e migração de fibroblastos (fibroplasia) no local da lesão (COALSON et al, 2019, LEITE et al, 2015; SINNO; PRAKASH S, 2013). No processo de granulação tecidual existem importantes agentes que atuam de maneira interdependente a fim de restabelecer a lesão, são eles: macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos. Os macrófagos por serem uma fonte contínua de fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e fibroplasia, os fibroblastos por atuarem na construção da nova matriz extracelular que dará suporte para a chegada de novas células de reparo e os vasos sanguíneos neoformados por transportarem o oxigênio e nutrientes à ferida (LEITE et al, 2015, KARUKONDA et al, 2000).

A angiogênese é um processo extremamente importante na formação do tecido de granulação. Ela se refere ao crescimento de novos vasos a partir de vasos pré - existentes que estão próximos a área lesionada, com a finalidade de restabelecer o suprimento sanguíneo e proporcionar oxigenação e nutrientes adequados ao tecido recém - formado. Está envolvida por uma série de mecanismos complexos, no qual, há a participação de vários fatores de crescimento e citocinas como: FGF, TGF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF (LEITE et al, 2015; ARNOLD; WEST, 1991).

Por sua vez, o mecanismo da fibroplasia é envolvido pela proliferação e migração dos fibroblastos para o interior da lesão através de estímulos de fatores de crescimento, como PDGF, FGF e TGF-  $\beta$ . No interior da lesão os fibroblastos que estão no local da ferida começam a sintetizar colágeno, especialmente fibras do tipo III, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elastina substituindo o tecido de granulação e constituindo a estrutura da matriz e espaços extracelulares, promovendo a remodelação tecidual. A remodelação do tecido envolvendo a síntese de novo colágeno é mediada pela expressão de TGF- $\beta$  e a quebra do colágeno antigo por PDGF (CHENG et al, 2002).

É nessa fase também que os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos para que aconteça a contração da ferida. Esta capacidade de contração acontece por intermédio da estimulação de 5- hidroxitriptofano, prostaglandina F<sub>1</sub>  $\alpha$  , angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina ou norepinefrina e pela participação do TGF- $\beta$  que contribui na aproximação das bordas das feridas (KARUKONDA et al, 2000).

Desse modo, os fibroblastos são os principais responsáveis na síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular, fornecendo força e resistência à ferida. São sintetizados colágenos do tipo I e III, mas são as fibras do tipo III as mais prevalentes na fase inicial da cicatrização. Após, um determinado período de tempo da lesão, em torno de um ano ou mais, o colágeno do tipo I passa a predominar em relação ao colágeno do tipo III, onde suas fibras colágenas são mais grossas, compactas, organizadas e reguladas pelas colagenases provenientes

dos fibroblastos (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O colágeno é o principal alicerce do tecido conectivo e é formado por uma tríplice hélice de cadeias de polipeptídeos  $\alpha$ , com uma sequência de repetição de gly - x - y. As combinações das três cadeias formam uma unidade básica de colágeno chamada tropocolágeno. Os filamentos de colágeno são compostas por subunidades de tropocolágeno, que por sua vez combinam para formar as fibrilas colágenas e que irão resultar nas fibras de colágeno (LEITE et al, 2015; KUMAR et al, 2005, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na fase final, ou de **remodelação tecidual**, há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal, ocorre à maturação da MEC em que através da ação das colagenases há o equilíbrio entre a formação do colágeno novo e à degradação do colágeno velho (síntese e degradação de colágeno), com a finalidade de restaurar e reestruturar o tecido. Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. Nesta fase, há o remodelamento da matriz extracelular, por meio das metaloproteinases (colagenases intersticiais, colagenases tipo IV e gelatinases) em que permite que as fibras de colágeno reorganizem-se em uma estrutura mais organizada. Após o período de um ano ou mais, como já mencionado previamente, a derme gradualmente retorna ao fenótipo pré-lesão com prevalência do colágeno do tipo I. Este tecido totalmente cicatrizado tem uma resistência à tração de 60% a 80% quando comparado a pele sem lesões (COALSON et al, 2019, KARUKONDA et al, 2000).

### 1.3 FERIDAS CUTÂNEAS

Existe um número considerável de pessoas com alterações na integridade da pele. Qualquer falha em uma das fases do processo de cicatrização acarretará o não fechamento da ferida e, conseqüentemente, provocará um atraso e/ou não ocorrerá à restauração total da estrutura tecidual (CARDOSO et al, 2011; VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009; GURTNER, et al, 2008).

Assim, as feridas cutâneas são definidas como o rompimento da continuidade anatômica e da fisiologia normal da pele e podem ser classificadas de duas formas: aguda e crônica. As feridas agudas são provenientes de procedimentos cirúrgicos ou por trauma que se cicatrizam por intenção primária, de forma ordenada e dentro do período esperado, sem acarretar complicações ao indivíduo e restabelecendo a integridade anatômica e funcional da pele, já as feridas crônicas geralmente se desenvolvem por falha em alguma fase do processo de

cicatrização, esta ferida se cicatriza por intenção secundária, onde ocorre de forma desordenada e com atraso no reparo do tecido, assim o tempo de cicatrização é maior que o esperado e podem acarretar complicações nos indivíduos (ROLDÁN-MARÍN et al, 2009; MENKE et al, 2007; PATEL; LABROPOULOS; PAPPAS, 2006; BARANOSKI; AYELLO, 2004, CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BELLO; PHILLIPS, 2000).

Desse modo, podemos definir a cicatrização por intenção primária aquelas feridas de espessura parcial que envolve a epiderme e a derme superior, no qual, as bordas dessas lesões estão próximas, gerando mínima cicatriz e restaurando a barreira epitelial, ao passo que, a cicatrização por intenção secundária ocorre quando há feridas de espessura total onde há destruição completa da epiderme e derme, podendo atingir até mesmo o tecido celular subcutâneo, muscular ou ósseo, nesta fase as bordas das feridas encontram-se distantes, cicatrizando de forma desordenada e com atraso no reparo tecidual. Desse modo, o reparo da perda do tecido é iniciado pela formação de tecido de granulação que substitui a “lesão” antes que ocorra a cobertura epitelial (SORG et al, 2017; CARDOSO et al, 2011; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Durante a fase inflamatória das feridas agudas, observa-se um equilíbrio em relação às citocinas pró e antiinflamatórias, entretanto, nas feridas crônicas, o processo inflamatório passa a ser persistente com ambiente altamente rico em proteases, acarretando redução a resposta das citocinas e fatores de crescimento, e conseqüentemente ocasionando um desequilíbrio local e impedindo que aconteça o processo inflamatório normal (MENKE et al, 2007; BARANOSKI; AYELLO, 2004; WALL et al, 2002).

Contudo, para que ocorra a reepitelização e conseqüentemente o fechamento da ferida, alguns detalhes devem ser levados em consideração, como localização, profundidade, tamanho e se há infecções presentes na lesão. Essas características da ferida podem estimar o período de duração e analisar sua evolução para a restauração completa do tecido epitelial ou se está desenvolvendo um reparo atrasado e vicioso, originando feridas crônicas prolongadas e de possíveis recidivas (SORG et al, 2017).

As feridas crônicas constituem um sério problema de saúde pública, além de acarretar aumento dos custos com assistência à saúde. Em decorrência ao aumento da expectativa de vida observa-se que a população idosa tem a maior probabilidade a desenvolver essas feridas, principalmente pela maioria possuir comorbidades associadas, tais como: diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e problemas vasculares que predispõem ao desenvolvimento dessas lesões e a dificuldade em cicatrizá-las. Para que o reparo das feridas ocorra adequadamente devemos então levar em consideração fatores locais e sistêmicos, a

nutrição ou suprimento sanguíneo inadequados, tecido necrótico e infecções locais são complicações presentes na grande maioria dos indivíduos com feridas crônicas e influenciam diretamente no processo de cura (EDSBERG et al, 2016; LIEDKE; JOHANN; DANSKI, 2014; COSTA et al, 2014).

Estima-se que o ônus para as feridas crônicas, especialmente dos membros inferiores (MMII) consiste em mais de 1 bilhão por ano em todo o mundo, apresentando uma prevalência nos membros inferiores (MMII) entre 0,18 a 1,3% na população adulta. As duas feridas cutâneas mais acometidas nos MMII são as úlceras venosas que correspondem a 40-70% e as úlceras diabéticas, acredita-se que entre 10-15% da população que sofre com diabetes mellitus poderá desenvolver as úlceras do pé diabético em algum momento de suas vidas. Além disso, essas feridas podem acarretar complicações ao indivíduo como a amputação em decorrência de problemas como insuficiência arterial, neuropatia periférica ou a combinação desses dois fatores (MARGOLIS, 2012).

Em países desenvolvidos estima-se que 1 a 2% da população venha ser portador de ferida crônica no decorrer da vida, acarretando impactos significativos aos acometidos, pois essa patologia tem uma instalação silenciosa, o que repercute em limitações e incapacidades que levarão a perda da qualidade de vida e influenciará nas questões psicológicas tais como depressão, ansiedade e angústia, além de ocasionar a restrição dos pacientes ao convívio social, fato este provocado pela dor, perda da função e mobilidade (JÄRBRINK et al, 2016).

Nos Estados Unidos (EUA) há dados que demonstram que 6,5 milhões de pacientes são acometidos pelas feridas crônicas, gerando um gasto de mais de US\$ 25 bilhões a cada ano para o tratamento de complicações relacionado a essas lesões. Já no Reino Unido em 2005 os tratamentos chegavam a custar entre 3,4 a 4,6 bilhões por ano ao Serviço Nacional de Saúde (JÄRBRINK et al, 2016).

De acordo com o Jornal do Estado do Rio de Janeiro (OERJ, 2015) dados do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) apontam que as feridas crônicas ocupam a 10ª posição entre os afastamentos do trabalho no Brasil, sendo mais de 200 mil pessoas afastadas de forma temporária ou permanente. Somente no Estado do Rio de Janeiro há cerca de 350 mil pessoas que convivem com essas feridas e suas sequelas. O Ministério da Saúde refere que esse problema atinge aproximadamente 5 milhões de brasileiros e que o tratamento para essa problemática é um desafio, visto ser uma doença de instalação silenciosa, pouco abordada e com diagnóstico clínico tardio.

Contudo, quando o assunto é traçar o perfil epidemiológico de certas patologias no Brasil, observamos que há falta de estudos epidemiológicos e dados disponibilizados pelos

órgãos de saúde para que se tenha a real dimensão dos problemas que acarretam à sociedade, o que nos impede de estabelecer o percentual de afetados e procurar alternativas para minimizar a prevalência das pessoas acometidas. A taxa epidemiológica em relação às feridas crônicas pode variar em relação alguns aspectos como: a dificuldade em chegar a um diagnóstico clínico correto da ferida e conseqüentemente uma intervenção eficaz, a dificuldade em desenvolver estudos que caracterizem a real taxa de prevalência da população acometida, o que pode subestimar a amostragem e implicar em dados não representativos dos números da população em análise (HEYER et al, 2016).

#### 1.4 MODELOS PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Existem diversos modelos experimentais aplicados e descritos na literatura, com a finalidade de investigar a fisiopatologia de doenças, compreenderem mecanismos de envelhecimento e do processo cicatricial, além de testar fármacos e novas terapias (MASSON-MEYERS et al, 2020; LEBONVALLET et al, 2010).

Modelos *in vitro* são caracterizados pelo cultivo de células em laboratório, possibilitando o estudo de vários aspectos celulares. Esses modelos são muito utilizados em decorrência da existência de metodologias bem estabelecidas, que permitem estudar a resposta celular, na qual as condições experimentais são mantidas por estar em um ambiente controlado, além de proporcionar um baixo custo comparado ao uso animal. Cabe a esse modelo analisar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico de tecidos normais ou patológicos, além de ser capaz de fornecer resultados prévios aos experimentos *in vivo*. Entretanto, tem uma menor complexidade por não possuir um sistema interligado, desse modo, não mimetizando o que de fato ocorre no organismo. Logo, eventos isolados que reproduzem parcialmente a resposta fisiológica, que ocorrem no organismo, são estudados (MASSON-MEYERS et al, 2020; FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Já no modelo denominado *in vivo* há o uso de uma infinidade de espécies de animais, como exemplo: ratos, zebrafish, coelhos e porcos. Este modelo ganhou um notório espaço nas pesquisas por estudar eventos do organismo considerados complexos, composto por vários sistemas que estão integrados e apresentam influência diretamente um sobre o outro. Porém, esses modelos animais mostraram algumas limitações importantes quando comparada a fisiologia humana da pele, há diferença da espessura da pele, mecanismo de fechamento da ferida que se difere do mecanismo humano, onde nos animais ocorre à contração da ferida e

não a reepitelização e o tempo de duração da cicatrização (RAKITA et al, 2020;MASSON-MEYERS et al, 2020; GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018).

Além do mais, há uma preocupação ética envolvendo o uso de animais, com intuito de conscientizar na redução e procurar métodos alternativos para substituir os testes in vivo. Criaram-se uma estratégia denominada 3Rs (do inglês, *Reduction, Refinement, Replacement*) que significa redução, refinamento e substituição, princípios estes mundialmente aceito, a fim de alterar os estudos com experimentos animais em laboratórios (LEITE M.N et al, 2021; RAKITA et al, 2020;MASSON- MEYERS et al, 2020;HUBRECHT; CARTER, 2019; DOKE; DHAWALE, 2015; RANGANATHA; KUPPAST, 2012).

Frente às limitações em que o modelo in vitro e in vivo apresentam, observa-se uma dificuldade de transpor os achados para a clínica, embora esses modelos tenham sido precursores para conhecer importantes mecanismos que envolvem o processo de restauração tecidual e minimizar os danos causados pelas feridas cutâneas. Portanto, existe a necessidade de novos modelos que tenham uma maior reprodutibilidade e relevância clínica (RAKITA et al, 2020; GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018).

Ademais, há o modelo de pele reconstruída em 3D, desenvolvida a partir da extração de células humanas (queratinócitos e fibroblastos). Assim, a recriação in vitro da derme a partir da cultura de fibroblastos e da epiderme a partir de queratinócitos, por ter uma morfologia e fisiologia similares à pele humana, esse modelo proporciona uma maior uniformidade e reprodutibilidade dos testes, garantindo uma maior assertividade (LEITE, M.N et al, 2021).

Por sua vez, os modelos ex vivo compreendem o isolamento do material primário de um organismo, estes permitem manter em parte a complexidade do sistema de origem (CASTRO; GILLESPIE; BERNSTEIN, 2019; FRADE et al, 2015; LEBONVALLET et al, 2010).

Os explantes de pele humana são fragmentos provenientes de cirurgias, mantidos em um meio artificial sob condições especiais de oxigenação, temperatura e nutrientes adequados que mimetizam seu ambiente de origem (PAULA, 2019). Apresenta-se em condições próximas a fisiologia normal da pele humana, capaz de manter nas condições artificiais todos os componentes da pele, como exemplo: os fibroblastos e queratinócitos, os quais são células que tem papel chave no processo de reparação tecidual, além de, permitir testes pré-clínicos mais fidedignos quando comparados ao modelo in vitro (FRADE, 2015; LEBONVALLET, et al, 2010).

Embora apresente algumas limitações como a falta de circulação (FRADE et al, 2015), ele está ganhando espaço laboratorialmente por se tratar de um modelo que mimetiza as estruturas da pele, estando mais próximo da fisiologia normal da pele humana.

Esse modelo experimental ainda é pouco difundido entre os pesquisadores, quando comparado ao uso dos modelos *in vitro* e *in vivo*, apesar de ser um modelo próximo do ideal no que diz respeito tanto a apresentar uma organização em 3D, como as funções do tecido (LEBONVALLET et al, 2010). Portanto, esse modelo tem se tornado alvo de interesse para uma pesquisa alternativa e mais próxima da clínica, sendo uma ferramenta valiosa para estudar a fisiologia da pele e avaliar novos tratamentos e os seus respectivos efeitos (MENDOZA-GARCIA et al, 2015).

Contudo, ao analisarmos esse modelo em relação à cicatrização de uma ferida, observa-se uma falta de padronização em diferentes aspectos, as variações vão desde o tamanho das feridas, bem como se elas são de espessura total ou parcial, até as diferentes condições dos meios de cultura e suporte em que são mantidos os fragmentos, portanto, podem interferir diretamente no estudo de processo cicatricial dessas feridas, sendo necessária uma padronização do modelo, a fim de evitar um viés na pesquisa (MENDOZA-GARCIA et al, 2015).

Diante dos modelos criados para minimizar e substituir o uso de animais observa-se que cada modelo alternativo possui características específicas importantes, a saber, (Tabela 1), a fim de compreender suas vantagens e desvantagens e optar pela melhor escolha durante a realização experimental (LEITE, M.N et al 2021).

Tabela 1 - Diferenças entre os modelos: ex vivo de pele humana hOSEC e de pele reconstruída em 3D em estudos de moléculas / produtos para efeito de ação da pele.

Características	hOSEC *	Franz Cell Diffusion **	Pele reconstruída em 3D ***
Custos de entrada	Baixo	Baixo	Alto
Requer equipamento específico	Não	sim	Não
Imitar condições in vivo (temperatura, CO <sub>2</sub> , umidade)	sim	Não	sim
Fonte de pele	Natural (qualquer fragmento de pele de humano ou animal)	Natural (qualquer fragmento de pele de humano ou animal)	Artificial
Viabilidade das células da pele	Sim por muito tempo	Nenhuma viabilidade considerada	Sim por muito tempo
Duração do experimento	Longo e curto	Baixo	Longo e curto
Pedido de estudos transdérmicos	sim	sim	sim
Aplicativo para uso tópico do produto acabado	Ainda não publicado	sim	sim
Aplicação para simular produtos sistêmicos absorvidos no tecido da pele	sim	Não	sim
Avaliação das camadas da pele separadamente	sim	sim	sim
Susceptível a contaminação microbiana	sim	Não	sim
Estrutura da cultura celular	sim	Não	sim
Dependência de doador de pele (animal ou humano)	sim	sim	Sim (para isolar células)
estandardização	Espessura e diâmetro da pele	Espessura e diâmetro da pele	Requer isolamento e crescimento celular adequado
Use a composição total da pele (queratinócitos, fibroblastos, melanócitos, células imunológicas ativas, estrutura do cabelo) diferenciando e metabolicamente ativa	sim	Não	Não completo, apenas queratinócitos e fibroblastos com ou sem melanócitos ou células endoteliais ou células de Langerhans
Hora de usar a pele	Imediato	Imediato	É necessário um longo processo de padronização

Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705815012527>



## 1.5 TERAPIAS UTILIZADAS EM MODELO EX VIVO

Há várias terapêuticas sendo estudadas para melhorar o reparo cicatricial. Pesquisas envolvendo o modelo ex vivo para aplicações das mais diversas terapêuticas tem demonstrado resultados positivos.

Zhang e colaboradores investigaram os efeitos da L-tiroxina (T4) na cicatrização de pele humana de espessura total, utilizaram pele proveniente da região temporal, mama, antebraço e nádegas. Hormônios tireoidianos (THs), em especial, T4 estimula a cicatrização de feridas in vivo (ratos e camundongos), frente às propriedades relatadas para promover a cicatrização de feridas pelo hormônio T4 em roedores, foi testado esse hormônio em diferentes concentrações (10 a 1000 nM) nesse modelo ex vivo.

A técnica utilizada neste estudo para avaliar proliferação e apoptose celular, angiogênese e a expressão de queratina epidérmica foi a imuno-histomorfometria quantitativa em que utilizou-se os seguintes anticorpos: Ki67 e o método de TUNEL, fator de crescimento de fibroblastos (FGF- $\beta$ , FGFR1), CD31(marcador de molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas), Queratina 6 e MTCO1 (citocromo C oxiasse 1). Neste modelo ex vivo de pele humana, o T4 pode promover características chave na cicatrização de ferida, em que fornece evidência pré-clínica que pode estimular a reepitelização e a angiogênese, principalmente devido à regulação positiva da sinalização mediada por FGF- $\beta$  / FGFR1 no epitélio ferido, além de modular a expressão de queratina epidérmica (ZHANG et al, 2019).

Além disso, outro estudo analisou os efeitos das células progenitoras nestin<sup>+</sup> isoladas do estroma de glândulas sudoríparas de humanos (células progenitoras na cicatrização de feridas humanas) em um modelo ex vivo. A avaliação da reepitelização e angiogênese ocorreu por dois ensaios: sendo imunofluorescência quantitativa para Ki67, método TUNEL e queratina 5 e imuno-histomorfometria quantitativa para os anticorpos CD31. Os achados demonstraram a capacidade de promover significativamente dois parâmetros-chave de cicatrização de feridas: a reepitelização e angiogênese, observando uma estimulação na regeneração epidérmica e colaborando na angiogênese da pele humana ex vivo (LIAO et al, 2019).

Para Mendonza-Garcia e colaboradores foi utilizado o modelo ex vivo, denominando-o em cultura de órgãos de cicatrização de feridas (WHOC), no qual, a terapêutica analisada foi à terapia fotodinâmica (TFD) no processo de cicatrização de ferida. Foi investigado o modelo ideal para a cicatrização tecidual, levando em consideração o tamanho da ferida, meio de cultura e suporte utilizado. A avaliação ocorreu por meio da histologia por meio das colorações de hematoxilina e eosina, Herovici e coloração diferencial elástica de Weigert. Já por meio da

imuno-histoquímica avaliou-se os anticorpos: PCNA (antígeno nuclear de proliferação célula), CK14 (citoqueratina 14), MMP3 (metaloproteinase 3), MMP19, CDKN2A/p16INKa (inibidor da quinase dependente de ciclina 2A), CD31. Além disso, realizou por meio da qRT-PCR os seguintes genes alvos: PCNA, Queratina- 14, MMP3 e MMP19, p16, colágeno I e III, RPL32 (proteína ribossomal L32 60S) e  $\alpha$ -SMA (actina de músculo liso). Seus respectivos resultados foram positivos, mostrando uma epiderme estratificada e derme compacta com desenvolvimento de neo-epiderme, totalmente diferenciada formando neo-colágeno, além disso, após a TFD, as línguas de reepitelização nas bordas das feridas eram mais longas e altamente proliferativas quando comparado aos controles (MENDOZA-GARCIA et al, 2015).

O mesmo grupo de pesquisadores analisou o estudo de cicatrizes hipertróficas e quelóides de pacientes submetidos à excisão da lesão, tendo como tratamento novamente o uso da terapia fotodinâmica (TFD) e associou a 2 precursores de protoporfirina IX (o ácido 5aminolevulínico (5ALA) e metil aminolevulinato (MALA)). A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio WST-1 (kit de proliferação celular WST-1), a citotoxicidade avaliada pelo ensaio de LDH (liberação de lactato desidrogenase), e a geração de ROS foi medida pelo acúmulo intracelular da sonda fluorescente 2', 7'-Diclorodi-hidrofluorescina (DCF). Além de avaliar por qRT-PCR alguns genes alvos como: RPL32, Colágeno I e III, entre outros. Como resultado após a TFD ocorreu à reorganização dos componentes da matriz nas cicatrizes hipertróficas e quelóides, sugerindo um papel importante da TFD no tratamento de fibrose, evidências estas já relatadas em estudos *in vitro* para tratamento de cicatrizes hipertróficas e quelóides (MENDOZA-GARCIA et al, 2015b; UD-DIN et al, 2013; CALZAVARA-PINTON et al, 2013; MENDONZA- GARCIA et al, 2012; CAI et al, 2011).

O uso da fototerapia em feridas tem se demonstrado uma das alternativas terapêuticas mais estudadas no processo de cicatrização por proporcionar potencial terapêutico, permitir a aceleração da cicatrização das úlceras durante reparo tecidual e ainda ser capaz de minimizar prejuízos secundários (RAWAT et al, 2012; DEMIR; BALAY; KIRNAP, 2004). Entretanto, na literatura, até o presente momento, não há estudos neste modelo *ex vivo* que analisaram exclusivamente a ação do laser. O que despertou, portanto, o interesse em investigar somente a ação do laser em diferentes comprimentos de onda neste modelo e, assim compreender os efeitos desse recurso terapêutico durante o processo de cicatrização.

## 1.6 FOTOTERAPIA

A fototerapia é um recurso altamente utilizado nos dias atuais, embora seja um dos métodos mais antigos descritos, no qual gregos e romanos utilizavam a luz solar (helioterapia) para fins terapêuticos (PINHEIRO; ALMEIDA; SOARES, 2017). Áreas da saúde como medicina, odontologia e fisioterapia aderiram esse recurso por observar efeitos positivos no organismo, além de tratar de um método não invasivo, seguro, de fácil aplicação que consiste na utilização da luz, isto é, uso de fótons que permite alterar a atividade biológica (GUPTA et al, 2013).

A terapia a laser de baixa intensidade, do inglês, Low-Level Laser Therapy (LLLT) teve seus primeiros relatos na década de 60, através do físico americano Theodore Maiman que desenvolveu o primeiro equipamento a LASER. Logo após o desenvolvimento do primeiro laser alguns médicos se interessaram e passaram a fazer o uso desse equipamento. Leon Goldman tornou-se um dos primeiros médicos a utilizar o laser em lesões de pele, em seguida Paul McGuff desenvolveu uma linha de pesquisa aplicando o laser rubi para estudar a destruição de melanomas malignos e a partir disso o médico húngaro Endre Mester relatou em 1964 as primeiras aplicações clínicas com laser rubi no tratamento de melanomas. Em 1971 Endre Mester passou a investigar a cicatrização de feridas para auxiliar seus pacientes com feridas diabéticas crônicas que não se cicatrizavam (MESTER; MESTER, 2017). Frente a estes estudos, diversos pesquisadores começaram a investigar os efeitos do laser a nível molecular, celular e tecidual, descrito a princípio por Tina Karu em 1988 (KARU, 1988). A partir disso, trabalhos começaram a mostrar que os efeitos no tecido até então atribuídos ao fenômeno da bioestimulação com laser, era na verdade a interação da luz com o material biológico. Assim, a irradiação da luz no espectro de onda vermelho e infravermelho pode aumentar o processo do metabolismo celular (KARU, 1988; LEITE et al, 2014).

Na atualidade tem se feito o uso do termo fotobiomodulação (PBM) para referir de forma mais abrangente a ação da luz, incluindo fontes de luz monocromáticas LASER/LEDs, em que há a interação de fótons com as moléculas, estimulando os processos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos em nível mitocondrial e aumentando o metabolismo celular. Desse modo, dependendo da intervenção e dos parâmetros estabelecidos os efeitos do laser podem agir tanto estimulando quanto inibindo os processos biológicos (MUSSTAF; JENKINS; JHA, 2019; HAMBLIN, 2016; KUFLER, 2015).

### 1.6.1 LASER e LED's

A ação do LASER/LED's ainda é bastante discutida na literatura, provocando controvérsia entre os pesquisadores, em decorrência da falta de padronização dos estudos. As melhores respostas terapêuticas exigem parâmetros bem estabelecidos em relação ao comprimento de onda, fluência e potência utilizadas, para que os objetivos propostos sejam atingidos.

O LASER, do inglês, *Light Amplifications by Stimulated Emission of Radiation*, que significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação é uma forma de energia eletromagnética monocromática e coerente nos níveis de luz vermelha e infravermelho próximo e se caracteriza por sua frequência, amplitude e comprimento de onda (LEITE et al, 2014; LEITE et al, 2014; COSTA, 2002).

De forma sucinta, todo aparelho de LASER consiste em uma cavidade, em que pode ser composto de substâncias (gasosas, líquidas ou sólidas) que ao serem excitados por uma fonte de energia externa, seus átomos ou moléculas que irão gerar luz laser. Essa energia produzida será absorvida pelos elétrons da camada de valência do meio ativo, que saltam para um nível de energia mais elevado. No entanto, esses átomos não conseguem manter esse estado de excitação por um longo período, assim quando os elétrons voltam para suas órbitas iniciais liberam 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 (LEITE et al, 2014; LEITE et al, 2014; COSTA, 2002).

Portanto, a luz laser tem algumas características importantes que as diferencia de outras fontes luminosas, a saber, seu feixe de luz é monocromático, no qual, apresenta uma cor correspondente a um único comprimento de onda do espectro eletromagnético; coerente, nos quais os fótons seguem uma única direção, sendo altamente ordenada e organizada; e colimado, onde a luz caminha na mesma direção (unidirecional), favorecendo a transmissão de uma grande quantidade de energia ao alvo (BAGNATO; PAOLITTO, 2014; LEITE, 2014; COSTA, 2002).

A luz ao atingir o tecido poderá ser refletida, espalhada ou absorvida, esta última especialmente permitirá a interação com os tecidos sendo que a quantidade de luz absorvida e espalhada na região superficial afetará a profundidade da radiação. Dessa maneira, a luz em determinado comprimento de onda exerce uma interação com o tecido, por mecanismo de absorção e espalhamento. Sendo que as luzes no vermelho/infravermelho próximo são

escolhidas porque sua penetração através do tecido é máxima nesta faixa de comprimento de onda, devido ao menor espalhamento e absorção pelos cromóforos do tecido (GAURAV et al, 2016; FREITAS; HAMBLIN, 2016; LEITE, et al, 2014; PASSARELLA; KARU, 2014).

Ademais, a eficácia da penetração no tecido está relacionada à absorção principalmente de 3 cromóforos biológicos: melanina na epiderme, hemoglobina no sangue e água nos tecidos. Isso porque os comprimentos de onda no espectro azul (435–500 nm) são absorvidos pela melanina, sangue e porfirinas, enquanto o espectro da luz vermelha (620–750 nm) penetra mais profundamente nas camadas da pele por estar mais sujeito a uma menor absorção pelo sangue e pela melanina. Esses cromóforos têm o menor impacto (absorção) nos espectros de luz infravermelho próximo (750–950 nm), onde a água se torna mais importante (MOSCA et al, 2019).

Por sua vez o LED, do inglês, *Light Emission Diode*, que significa Diodo Emissor de Luz, é uma fonte de luz alternativa ao uso dos lasers. Os mecanismos de ação dos LED's no tecido biológico são similares ao da terapia a laser de baixa intensidade, embora haja algumas propriedades diferenças presentes no uso da fototerapia por LED como uma maior divergência no feixe de luz (emissão de luz não coerente) e maior largura da banda espectral (DE JESUS GUIRRO et al, 2020, HUANG et al, 2009).

### **1.6.2 Mecanismos moleculares após a fotobiomodulação**

Frente à fotobiomodulação os mecanismos a nível molecular têm demonstrado diversas respostas celulares e teciduais. Tina Karu em 1988 descreveu seus primeiros estudos sobre os mecanismos do laser e a interação com tecido, a nível molecular. A partir desses trabalhos, ela mencionou que as mitocôndrias funcionavam como fotoacceptores primários nas células, e que o citocromo C oxidase (COX) ou complexo IV é a molécula responsável da cadeia respiratória mitocondrial, visto que os fótons interagem com o tecido e se transformam em energia bioquímica, que será utilizada na cadeia respiratória mitocondrial (LEITE et al, 2015; KARU, 2008).

Os mecanismos de ação diferem entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho próximo após a ação da luz na molécula do COX, a excitação dessa molécula desencadeia o metabolismo celular, por meio de cascatas de reações, denominada sinalização mitocondrial retrógrada (LEITE, 2015; KARU, 2010; KARU, 2008).

A sinalização mitocondrial retrógrada, portanto, é uma via de comunicação entre as células da mitocôndria ao núcleo, transformando assim informações do núcleo e do citoplasma

para a mitocôndria, e posteriormente essas informações serão enviadas de volta ao núcleo sobre as mudanças no estado funcional da mitocôndria (KARU, 2008). Esse conceito da sinalização mitocondrial retrógrada permitiu compreender como a exposição à luz pode ter efeitos no organismo que durem por horas, dias ou semanas, no qual essa via permite enviar informações ao núcleo sobre mudanças no estado funcional das mitocôndrias (HAMBLIN, 2016; KARU, 2008).

A fotobiomodulação ativa a cadeia respiratória via mitocôndria, por absorção da luz no COX, o que ocasiona um aumento no metabolismo oxidativo da mitocôndria e por consequência aumenta-se a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que passa assim produzir moléculas sinalizadoras que promovem uma cascata de reações intracelulares. As reações primárias dessas moléculas fotorreceptoras levam às respostas fotobiológicas a nível celular através da ativação de cascatas bioquímicas, como a ativação de genes de fatores de transcrição, enzimas e vias relacionadas com o aumento do metabolismo oxidativo. (LEITE et al, 2015; KARU, 2008).

Outra via de sinalização envolvendo as mitocôndrias está relacionada à adenosina trifosfato (ATP), que implica em todas as reações biológicas, pois pequenas alterações a nível ATP podem ocasionar mudanças metabólicas significantes no organismo (KARU, 2010). Portanto, as células absorvem fótons e os transformam em adenosina trifosfato (ATP), que será utilizado nos processos metabólicos como: síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas e enzimas. Isso permite explicar a versatilidade dos efeitos do uso na luz LASER. (LEITE, et al, 2015; PRINDEZE; MOFFATT; SHUPP, 2012; KARU; PYATIBRAT, 2011; KARU et al 2005; KARU, 1999).

Alguns autores destacam o papel específico das ROS nas mitocôndrias na sinalização mitocondrial retrógrada, referindo que as ROS mitocondriais podem ser consideradas um fator importante na sinalização celular, em que se inicia após as reações primárias a nível mitocondrial uma cascata de sinalização celular (reação secundária) sendo regulada pelo estado redox intracelular (estado óxido-redução da célula). Essas células acabam sendo expostas em diversas circunstâncias de estresse no ambiente intracelular e extracelular acarretando uma contínua exposição de ROS, acarretando citototoxicidade celular. No entanto, já se sabe também que as ROS são mensageiras secundárias da sinalização de ativação e morte celular e que o estado redox intracelular exerce função importante na regulação fisiológica de sinalização de outras células (LEITE et al, 2015; KARU, 2008; MATSUZAWA; ICHIJO, 2005 ).

Tina karu (1988), referiu que a ativação do metabolismo celular quando utilizado a luz visível é dada através da regulação do estado redox celular. A partir disso, a ideia relacionada

ao estado redox e a relação aos efeitos da fototerapia esta voltada para uma resposta celular fraca ou ausente quando o potencial redox é ótimo ou próximo. Isto quer dizer que a resposta celular é mais significativa quando o potencial redox da célula é inicialmente modificado para uma estado reduzido (baixo pH intracelular). Assim, isso pode explicar porque no momento da irradiação a célula em um estado redox reduzida responde a luz de maneira mais eficaz do que quando comparada a outras células em condições normais, sendo que essa geração de ROS mitocondrial tem sido utilizada para investigar os mecanismos da terapia a laser de baixa potência (LEITE et al, 2015, KARU, 1988).

Mesmo diante dos grandes avanços adquiridos nas pesquisas voltadas a compreender os mecanismos do processo de cicatrização e da relevância dos trabalhos que estudam as feridas crônicas para acelerar o reparo tecidual, as feridas crônicas ainda têm uma alta prevalência e incidência na população, acarretando custos elevados a saúde pública e provocando uma alta demanda em centros hospitalares. Por isso novas terapêuticas tem sido o foco de vários pesquisadores, sendo a fototerapia um recurso amplamente utilizado nos últimos anos em decorrência do seu potencial de aceleração e recuperação das feridas, no entanto, seus parâmetros ainda são controversos na literatura sendo necessário aprofundá-los, pois as melhores respostas terapêuticas exigem parâmetros bem estabelecidos, a fim de atingir os objetivos propostos, tornando-se assim relevante e necessário o desenvolvimento de outros estudos.

Em decorrência das respostas adquiridas com a fototerapia em pesquisas prévias in vitro e in vivo no processo de reparo tecidual, este trabalho foi desenvolvido com ênfase em avaliar a ação do laser em diferentes comprimentos de onda no modelo ex vivo de pele humana, com a finalidade de melhor entender o comportamento, bem como de ampliar os conhecimentos sobre o processo de cicatrização das feridas neste modelo, o qual é considerado mais próximo da fisiologia da pele humana.

# 2 OBJETIVO

**“Comprometa-se com suas metas e encare os obstáculos como etapas para atingir o objetivo final”  
Lair Ribeiro**

Avaliar a eficácia da terapia a laser de baixa intensidade (660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm aplicados consecutivamente) no processo de cicatrização de úlceras experimentais no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC).

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficácia do laser no comprimento de onda vermelho (660nm), infravermelho (830nm) e fototerapia associado (830 nm + 660nm) na cicatrização de úlceras cutâneas no modelo hOSEC;
- Avaliar por meio da histopatologia a cicatrização das úlceras cutâneas no modelo hOSEC após a aplicação da fototerapia;
- Avaliar o estresse oxidativo por meio dos ensaios de GSH, DPPH, MDA e FOX na cicatrização das úlceras cutâneas no modelo hOSEC após a aplicação da fototerapia
- Avaliar a expressão gênica para os genes alvos COL1A1, COL3A1, MMP-1, CCND1 e  $\beta$ - actina na cicatrização das úlceras cutâneas no modelo hOSEC após a aplicação das diferentes formas de fototerapia.



# 3 MATERIAL E MÉTODOS

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”  
Arthur Schopenhauer

## 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo processo (nº10757/2018).

Para o desenvolvimento da pesquisa houve o consentimento e concordância do Setor de Cirurgia Plástica, pelo chefe de divisão de cirurgia plástica HC-FMRP-USP, Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Júnior (número parecer: 2.974.802). Posteriormente os doadores de pele submetidos ao estudo da Influência da fototerapia na cicatrização no modelo ex vivo de pele humana (hOSEC) foram esclarecidos sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico, com a finalidade de usar a pele proveniente de abdominoplastias eletivas, a qual, seria descartada no centro cirúrgico.

## 3.2 CULTURA ORGANOTÍPICA DE EXPLANTE DE PELE HUMANA (hOSEC DO INGLÊS – *HUMAN ORGANOTYPIC SKIN EXPLANT CULTURE*)

Para a padronização do modelo, a pele humana utilizada foi somente de cirurgias plásticas provenientes de abdominoplastias eletivas, visto a maior facilidade de manipulação para realização da úlcera, em decorrência da espessura da pele do abdome ser maior quando comparada, por exemplo, à pele obtida de cirurgias plásticas de mamoplastias, permitindo assim úlceras mais regulares, as quais seriam descartadas no centro cirúrgico. Após a excisão a pele foi acondicionada em um recipiente de vidro estéril, fechado hermeticamente e mantido em caixa térmica para transporte do centro cirúrgico até o laboratório.

Com a chegada ao laboratório iniciou-se o procedimento de descontaminação da pele, no qual, o fragmento foi mantido a 4°C na geladeira *overnight* em uma solução de tampão

fosfato- salino (PBS) e antibiótico/ antimicótico a 1,5% (penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 mg/mL, Gibco® - Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA).

A remoção do tecido subcutâneo ocorreu no dia seguinte, logo pelo período da manhã, após ter transcorrido aproximadamente 12h da descontaminação da pele. Foi utilizado o fluxo laminar. Com auxílio de uma tesoura curva e de uma pinça o tecido subcutâneo foi removido permanecendo apenas a região da epiderme e derme. Posteriormente foram realizadas as úlceras com um *punch* cirúrgico de 3 mm de diâmetro na região central da pele, fazendo-se uma leve pressão desse *punch* para que a profundidade da úlcera não ultrapassasse a derme superficial, assim utilizou-se uma tesoura *castroviejo vannas* curva 11cm para fazer a retirada da epiderme e derme superficial, logo após foram seccionados os fragmentos de pele (explantes) em círculos de 10 mm de diâmetro, com auxílio de um *punch* cirúrgico (Figura 3). A duração para cada experimento foi de aproximadamente 8h, totalizando 189 fragmentos seccionados, estes mantidos em triplicata.

Figura 3 - Montagem do experimento



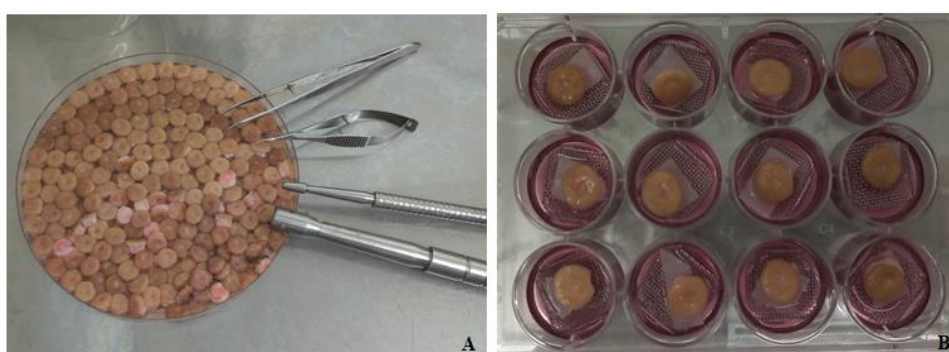
Fragmento de pele obtida de abdominoplastia, usada para montagem do hOSEC. (A) úlceras foram realizadas com um *punch* cirúrgico de 3 mm de diâmetro na região central da pele. (B) retirada da epiderme superficial com tesoura *castroviejo vannas* curva 11cm.(C) seccionados os explantes de pele em círculos de 10 mm de diâmetro, com auxílio de um *punch* cirúrgico.

Deste modo, os fragmentos foram colocados nas placas de cultura de 12 poços, contendo um fragmento por poço (Figura 4). A região da derme de cada explante permaneceu sobre um papel filtro (80 g/m<sup>2</sup>, permeabilidade ao ar 26 l/s m<sup>2</sup>, porosidade 25 µm) e apoiada sobre grades metálicas (ácido inoxidável) que proporcionou uma interface líquido/ar ao fragmento.

Os explantes de pele foram mantidos no meio de cultura: Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 1/3 Keratynocyte Serum Free Medium (K- SFM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% L-glutamine e 1% de solução antibiótica (todos os

produtos utilizados foram da Gibco®- Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA), foi adicionado ao poço da placa um volume de 2 mL que mantinha a epiderme acima da interface líquido/ar, a primeira troca de meio foi realizada logo após as primeiras 24 h, em que o meio encontrava-se ácido, consistindo na retirada 1 mL do meio antigo e adicionado 1 mL do meio novo, após esse período os meios passaram a ser trocados a cada 2 dias até os explantes de pele completarem o período de 6 dias de cultivo. Estes fragmentos foram mantidos na incubadora a 37°C e 5% de CO<sup>2</sup>.

Figura 4 - Placa de cultura



(A) explantes seccionados e mantidos em placa *petri* com salina até serem transferidos as placas de 12 poços. (B) placa de cultura de 12 poços, com explantes de pele (10 mm de diâmetro), úlceras (3 mm de diâmetro) na região central do explante, sobre papel filtro e grades metálicas. Meio de cultura DMEM+1/3 K- SFM.

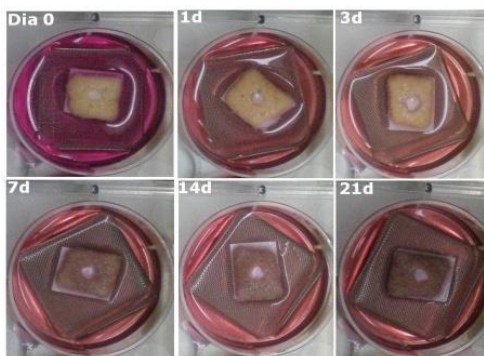
### 3.3 PADRONIZAÇÃO DO MODELO hOSEC

Os explantes utilizados no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da FMRP- USP para o estudo de cicatrização de feridas (MASSON, D.S et al 2013), tinham anteriormente a seguinte dimensão: fragmentos com 10 mm de diâmetro, seccionados por tesoura cirúrgica e úlcera com 4 mm de diâmetro na região central realizado com *punch* cirúrgico (Figura 5). Assim, este estudo levou em consideração as mesmas dimensões já trabalhadas previamente pelo grupo, substituindo apenas a tesoura cirúrgica para seccionar os fragmentos de 10 mm por um *punch* cirúrgico. Foi utilizada a aplicação da luz Laser para analisar os efeitos causados no modelo, já que até o momento, não há artigos que abordem a ação do Laser no comprimento de onda 660 nm (luz vermelha) e 830 nm (luz infravermelha) no modelo de explantes de pele humana.

Inicialmente o proposto foi um período de intervenção estabelecido de 30 dias, retirando os fragmentos nos tempos D0, D7, D14, D21 e D30 para as análises de histologia, bioquímico e

biologia molecular, estes fragmentos mantidos em triplicata, com aplicações 3 vezes na semana em dias alternados.

Figura 5 - Imagem dos explantes utilizados anteriormente pelo grupo de cicatrização



Representação fotográfica dos fragmentos de pele humana em cultivo por 21 dias, explantes de pele (10 mm de diâmetro) seccionados por tesoura cirúrgica, úlceras (4mm de diâmetro) na região central do explante, sobre papel filtro e grades metálicas. Meio de cultura DMEM.

Após diversos testes preliminares em que se avaliou por meio da histologia a migração celular nas bordas das feridas e pelos resultados não tão satisfatórios, foi necessário rever a literatura sobre o modelo *ex vivo* na cicatrização de feridas e a partir disso algumas mudanças foram propostas.

Realizaram-se testes para definir a melhor solução a ser aplicada no local da úlcera, já que a região da úlcera poderia estar muito seca e desse modo impedir a migração celular. Bem como, o tamanho das úlceras, que teve o teste inicial de 4 mm, e posteriormente testou-se 3 mm e 2 mm, identificando melhor resposta nas úlceras de 3 mm. O tempo de duração do cultivo dos explantes foram alterados de 30 dias para 15 dias, chegando ao melhor resultado em 6 dias obtendo menores taxas de perda por contaminação. Em relação ao laser, analisou-se o número de doses aplicadas, como o tempo de cultura foi reduzido, testou-se 2 aplicações por semana no período de cultivo de 15 dias, e nos testes com cultivo de 6 dias a aplicação foi de 3 doses no total.

Dessa forma, este estudo seguiu as seguintes condições: fragmentos no diâmetro de 10 mm, com as úlceras reduzidas para o diâmetro de 3 mm. Para a aplicação da solução nas úlceras foi utilizada DMEM+ 1/3 K- SFM suplementado, no volume de 5  $\mu$ L. Por sua vez, para a aplicação do laser ocorreu o total de 3 doses, aplicado a primeira dose após as 24h de estabilização dos fragmentos, seguido por outras duas doses que foram realizadas nos dias 3 e 5 do cultivo tecidual, a duração da cultura foi de 6 dias, sendo analisada os fragmentos no tempo D0, D2, D4 e D6, em que, todos fragmentos foram retirados após 24h da ação do laser.

### 3.3.1 Definição dos grupos

Foram constituído 4 grupos, sendo cada grupo mantido em triplicata, a saber:

**Grupo controle:** explantes não foram irradiados, sendo submetidos apenas pela aplicação da solução DMEM+ 1/3 K- SFM suplementado nas úlceras no volume de 5  $\mu$ L.

**Grupo 660 nm:** os explantes foram submetidos à fototerapia no comprimento de onda 660 nm, isto é, utilizado a luz vermelha, com uma dose de 2J, mantida a aplicação por 20 seg a cada fragmento.

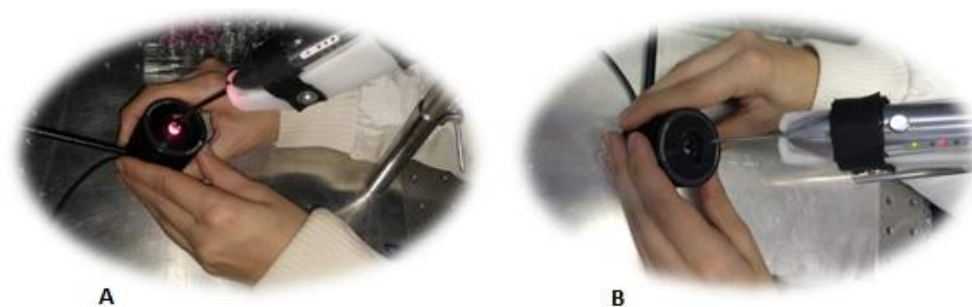
**Grupo 830 nm:** os explantes foram submetidos à fototerapia no comprimento de onda 830 nm, isto é, utilizado a luz infravermelha, com uma dose de 2J, mantida a aplicação por 20 seg a cada fragmento.

**Grupo 830 nm + 660 nm:** os explantes foram submetidos à fototerapia associada de forma consecutiva, isto é, utilizado a luz infravermelha (830 nm) seguida da luz vermelha (660 nm), totalizando uma dose de 4J, mantida a aplicação por 40 seg a cada fragmento.

### 3.4 APARELHO DE FOTOTERAPIA E MODO DE APLICAÇÃO

Para realização do estudo o aparelho utilizado foi o Flash Lase III da DMC Equipamentos LTDA<sup>®</sup>, estando este devidamente calibrado em parceria com Departamento de Física - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Figura 6).

Figura 6- Calibração do aparelho



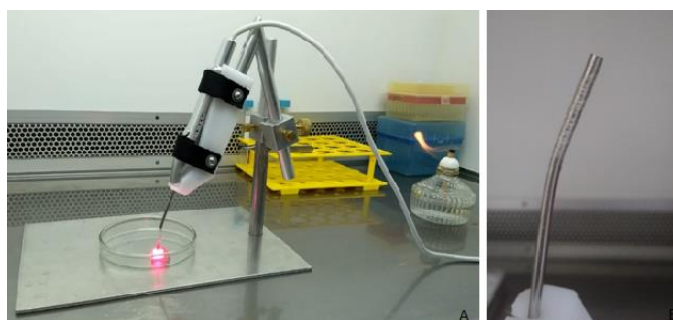
Calibração do aparelho em parceria com Departamento de Física - FFCLRP. (A) Laser vermelho no comprimento de onda de 660nm. (B) Laser infravermelho no comprimento de onda de 830nm.

Operando em um comprimento de onda de 660 nm (laser vermelho), 830 nm (laser infravermelho), com potência de 100 mW, fluência de 70 J/cm<sup>2</sup> e dose de 2J para o grupo 660 nm e grupo 830 nm, onde o tempo de aplicação foi de 20 segundos por fragmento. Já para o

grupo 830 nm + 660 nm a dose foi de 4J, com duração de 40 segundos por fragmento, em que ocorreu a aplicação da luz infravermelha (830 nm) seguida pela aplicação da luz vermelha (660 nm).

Para que a irradiação ocorresse de forma igual a todos os fragmentos, foi padronizado um suporte para o aparelho pela Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus USP-Ribeirão Preto, que permite modificar a angulação desejada no momento da aplicação da luz, já que a ponteira do aparelho é levemente curvada. A angulação escolhida foi a 90°, a qual permite que a superfície da úlcera fique em contato direto ao fragmento e recebesse a luz sem perdas (Figura 7).

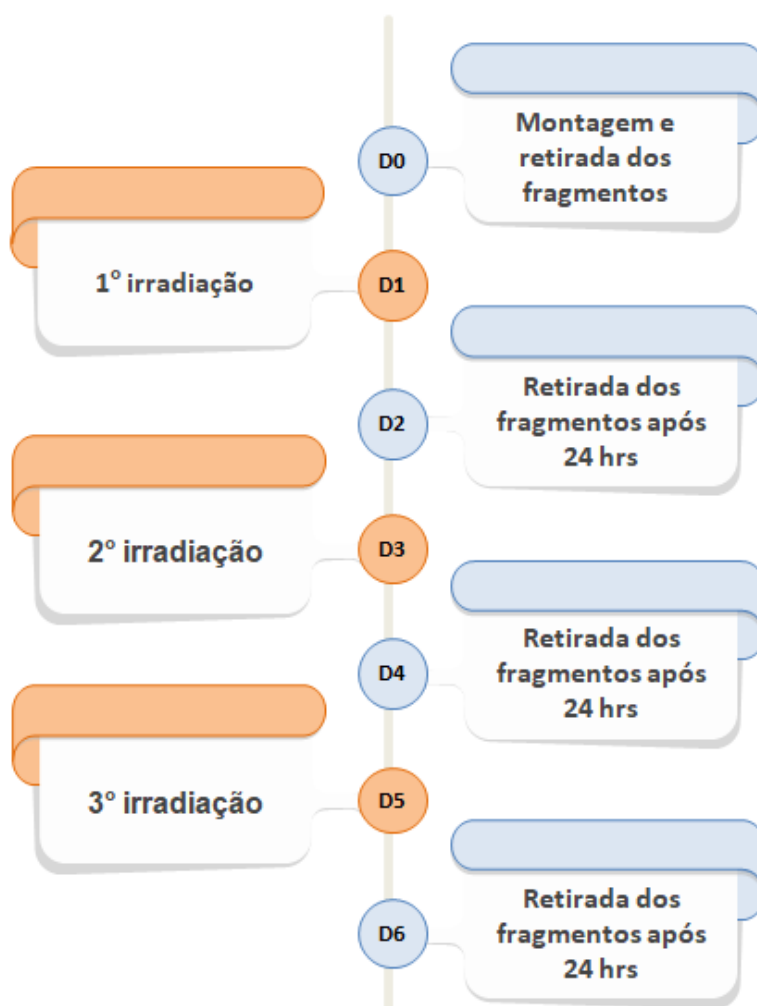
Figura 7 - Suporte de apoio padronizado



(A) Suporte de apoio ao aparelho, produzido pela Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus USP-Ribeirão Preto, mantido em uma angulação de 90° para a aplicação da luz. (B) Ponteira do aparelho levemente curvada com plástico filme PVC enrolado em sua extremidade, apenas uma volta.

A fototerapia aconteceu dentro do fluxo laminar, no dia seguinte a montagem do experimento com estabilização de 24h (Figura 8). A irradiação nas úlceras ocorreu de modo estacionário, pontual e isolando fragmento por fragmento. O isolamento do fragmento só foi possível com o auxílio de uma pinça estéril para transferir o fragmento da gride metálica até uma placa de *petri*, deixando este sozinho para a aplicação da luz, além disso, foi usada uma barreira, isopor encapado com papel alumínio, entre as placas de cultura que continham os fragmentos e a placa de *petri*, impedindo que a luz se propagasse aos demais fragmentos dos outros poços da placa e ocasionasse uma dose acumulativa. Afim de não ocorrer e evitar uma contaminação inter- fragmentos foi mantido um bico de *bunsen*, dispositivo este usado para aquecer a ponta da pinça a cada troca de fragmentos, permitindo assim sua esterilização. Além disso, para que a ponteira do aparelho pudesse encostar ao fragmento e evitasse uma perda da dose estipulada, bem como evitar a contaminação dos explantes, utilizou-se um plástico filme PVC na extremidade da ponteira (apenas uma volta), sem alterar a passagem de luz, constatado pelo Departamento de Física.

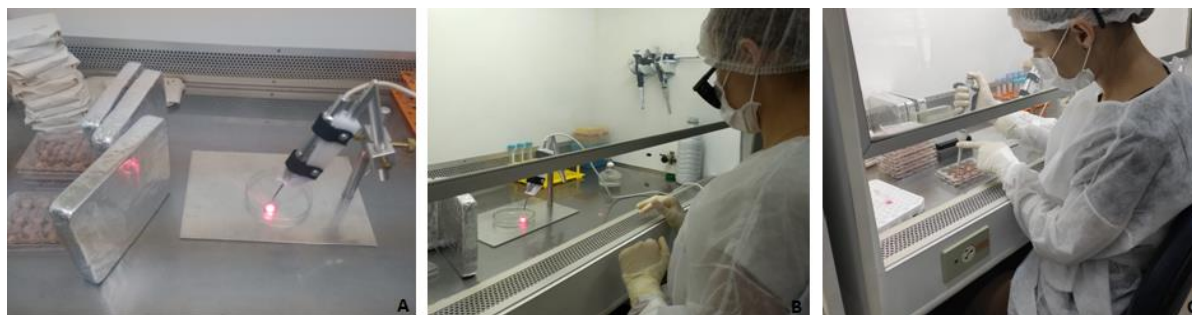
Figura 8 - Linha do tempo indicando os dias de irradiação e a retirada dos fragmentos



A irradiação ocorreu nos dias 1, 3 e 5 e as retiradas dos fragmentos para as respectivas análises: histológica, bioquímica e molecular foram retiradas nos tempos 0, 2, 4 e 6 após 24 horas da aplicação do laser

Em cada placa de 12 poços foram dispostos fragmentos em triplicata sendo sequencialmente, um grupo controle, um grupo 660 nm, um grupo 830 nm e um grupo 830 nm + 660 nm, totalizando 15 placas por experimento, no qual, a irradiação iniciou-se pelo grupo 660 nm, ocorrendo à aplicação da luz vermelha, seguido do grupo 830 nm com a aplicação da luz infravermelha e finalizando pelo grupo 830 nm + 660 nm, onde a aplicação iniciou sempre pela luz infravermelha, seguida da luz vermelha. Após o término da irradiação dos fragmentos por placa, aplicou-se em seguida a solução de DMEM + 1/3 K-SFM suplementado, sobre as úlceras de todos os grupos, incluindo a aplicação ao grupo controle, no volume de 5  $\mu$ L, com a finalidade de mimetizar uma ferida humana, a qual, a área da ferida geralmente encontra-se úmida e permite desse modo estimular a formação do tecido de granulação e a epitelização (Figura 9).

Figura 9 - Modo de aplicação da fototerapia e da solução (DMEM+ 1/3 K-SFM)



(A) Ambiente em condições estéreis (fluxo laminar) e isolamento das placas para que não ocorresse dose acumulativa aos fragmentos.(B) Irradiação de forma isolada, pontual e estacionária.(C) Aplicação de 5 $\mu$ L da solução (DMEM+ 1/3 K-SFM) sobre as úlceras.

### 3.5 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

A cada retirada dos fragmentos nos tempos propostos no estudo (D0, D2, D4 e D6), as amostras foram fixadas por 24 horas em solução de formol 10% tamponado (tampão fosfato a 0,1M, com pH 7,4),posteriormente transferidas para álcool 70%, onde permaneceram até o dia da inclusão em parafina, quando passaram em uma bateria de desidratação: álcool 80%, 90% e 95%, 1 hora em cada; álcool absoluto I, II e III, 1 hora em cada; solução álcool-xilol (1:1) *overnight*; xilol I, II e III por 1 hora cada; parafina à 60°C por 2h; e assim os fragmentos foram cortados na região central da úlcera e emblocados em cassetes próprios com parafina, de forma que a face interna do explante (região central) ficasse voltada para a face de microsecção do bloco.

Foram realizados cortes de 5  $\mu$ m de espessura em lâminas de histologia para a coloração HE, com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eosina (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, BR).

#### 3.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

Inicialmente, as lâminas permaneceram em estufa 60°C por 1h, para que a parafina dos cortes escorresse, após isso as lâminas passaram por bateria de desparafinização em xilol I, II e III (Synth, LabSynth - Diadema, Brasil) e mistura álcool absoluto + xilol (1:1) 2 min cada, em seguida, realizou-se hidratação em uma sequência de alcoóis: absoluto I e II, álcool 95%, 70%, 50% (Synth, LabSynth - Diadema, Brasil) 2 min cada um, 5 min em água corrente e 2 enxágues em água destilada; e coradas em hematoxilina por aproximadamente 6min, lavadas em água corrente por 5 min., 1 enxágue em água destilada e uma imersão em álcool 80%, permanecendo



em eosina por aproximadamente 1 min. Para a montagem, a lâmina foi passada em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto I e II, mistura álcool absoluto + xilol (1/1), xilol I e xilol II, e então a lamínula foi fixada com meio de montagem Entellan (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha).

A análise e imagens foram realizadas em microscópio ótico LEICA<sup>®</sup> DM-4000B (Leica Microsystems, Alemanha) equipado com uma câmera LEICA DFC<sup>®</sup> 280 (Leica Microsystems, Germany), mantendo um adaptador de *smartphone* acoplado ao microscópio, com a finalidade de visualizar e capturar a região da úlcera panoramicamente, o celular utilizado para captura das imagens histológicas foi o MOTO E6 PLUS, com uma câmera de 13mpx, sem o uso de *flash* e *zoom* (Figura 10).

Figura 10 - Microscópio com *smarthphone* acoplado



Foto do microscópio ótico LEICA<sup>®</sup> DM-4000B (Leica Microsystems, Alemanha), acoplado *smartphone* (sem uso de *zoom* ou *flash*) para captura das imagens histológicas.

### 3.6 ESTUDO BIOQUÍMICO

Para a realização do estudo bioquímico inicialmente as amostras que estavam acondicionadas em microtubo de 2 mL no -80°C a seco foram pesadas, posteriormente o tecido foi macerado pelo homogeneizador de tecidos, Omni TH<sup>®</sup> em 2 mL de tampão fosfatado sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,1M; PH 7.0), centrifugado a 3500rpm por 10min, sendo transferido 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra para um microtubo de 1,5 mL para as respectivas análises de malondialdeído (MDA), hidroperóxidos (FOX), glutathiona reduzida (GSH), radical 2,2 difenil-1- picrilhidrazil (DPPH) e 10  $\mu\text{L}$  em um microtubo de 2 mL para a análise de proteína.

### 3.6.1 Glutathiona Reduzida - GSH

O ensaio colorimétrico da glutathiona adaptado de Sedlak; Lindsay (1968) consiste no uso da glutathiona redutase e o reagente DTNB (L ácido 2,2'- dinitro- 5-5' ditiobenzóico). A glutathiona redutase é capaz de reduzir o GSSG (glutathiona oxidada) ao GSH, já o DTNB reage com o GSH para formar o cromóforo amarelo, e assim, ser possível quantificar as amostras.

No microtubo contendo os 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram acrescentados 250 µL de EDTA a 0,02M, 200 µL de água Milli Q e 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%, essa diluição do ácido deve ocorrer somente na hora em que o mesmo será utilizado. Nessa etapa deve-se aguardar por 15min agitando na metade do tempo e antes de centrifugar as amostras. A centrifugação ocorreu a 3500 rpm, por 15min a 4°C. Após centrifugar, foi transferido a um microtubo de 2 mL, 250 µL do sobrenadante, adicionado 250 µL de TRIS (pH 8,9) e 25 µL de DTNB, aguardando por 5min, após foi pipetado na placa de 96 poços, pipetado um volume de 200 µL para realizar a leitura da absorbância no comprimento de onda de 412nm e comparado a uma curva padrão para GSH de 10 mM.

### 3.6.2 Radical 2,2 difenil- 1- picrilhidrazil - DPPH

O ensaio de DPPH foi desenvolvido por Blois (1958), baseando-se na medição da capacidade de eliminação de antioxidantes, com algumas adaptações. Neste método a solução de DPPH possui uma coloração púrpura e sua ação antioxidante pode ser observada pela progressiva descoloração, a qual se torna amarela.

No microtubo contendo os 100 µL do sobrenadante de cada amostra, adicionou 400 µL de solução DPPH (2,4mg de DPPH em 100 mL de metanol). Após a adição da solução, esperou-se por 30min, sendo agitado em vórtex a cada 15min e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 10min. Pipetado um volume de 200 µL na placa de 96 poços e realizado a leitura da absorbância no comprimento de onda de 515 nm. A curva padrão para o DPPH é preparada com trolox (1000µg/mL), com ponto zero (100 µL H<sub>2</sub>O + 400 µL).

### 3.6.3 Malondialdeído- MDA

O MDA é um importante biomarcador na avaliação de estresse oxidativo, sua quantificação é capaz de medir o índice de peroxidação lipídica presente na amostra. Este ensaio colorimétrico foi realizado de acordo com o método proposto por Gerard- Monnier et al

(1998), com algumas adaptações. No microtubo contendo os 100 µL do sobrenadante de cada amostra, foi adicionado 300 µL de solução na concentração de 10 mM de 1 metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75 µL de HCL fechando-o imediatamente. Logo após, os microtubos foram agitados em vórtex e incubados a banho-maria a 45°C, por 40 min. Após o banho, os microtubos foram abertos, evitando que os microtubos estourassem na hora da centrifugação. Posteriormente ocorreu a centrifugação a 3500 rpm por 15 min, sendo pipetado 200 µL do sobrenadante em placa de 96 poços para leitura da absorbância no comprimento de onda de 586 nm. A concentração de MDA foi calculada comparando a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado. Para efeito de comparação entre as peles, foi realizado uma normalização da pele 3, sendo dividido cada valor das respectivas amostras por 10.

### 3.6.4 Hidroperóxidos - FOX

A determinação do total de hidroperóxidos foi realizada segundo metodologia descrita por Costa, Santos e Lima (2006). Assim como o MDA, este ensaio consiste na avaliação do nível de peroxidação lipídica presente na amostra. O método FOX é baseado na oxidação do  $Fe^{+2}$  (íon ferroso) a  $Fe^{+3}$  (íon férrico), por vários tipos de peróxidos contidos nas amostras a serem analisadas. Na presença de xilenol orange forma-se um complexo colorido (xilenol orange-férrico) de cor azul púrpura, cuja absorbância pode ser medida.

Nesse método é usada uma substância, na qual, é preparada no dia da leitura (o reagente FOX). Para 100 mL de solução deve-se pesar 7,6 mg de xilenol orange e 88 mg de BHT (butil-hidroxitolueno) em 90 mL de metanol. Posteriormente pesa-se 9,8 mg de sulfato ferroso em 10 mL de ácido sulfúrico 250 mM (0,13 mL de ácido sulfúrico em 10 mL de água). Logo em seguida essas duas soluções que foram preparadas devem ser misturadas em uma concentração 9:1.

No microtubo contendo os 100 µL do sobrenadante de cada amostra é acrescido 1 mL da solução preparada no dia da leitura, permanecendo por 30 min no escuro a temperatura ambiente, sendo agitado em vórtex na metade do tempo (15 min) e antes da centrifugação. Após esse período, centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Desse modo é pipetado um volume de 200 µL na placa de 96 poços e realizado a leitura da absorbância no comprimento de onda de 560 nm. A concentração de FOX foi calculada comparando curva padrão feita com  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) em concentrações de 10 a 200 µM. Para efeito de comparação entre as peles, foi realizado uma normalização da pele 1, sendo multiplicado cada valor das respectivas amostras por 10.

### 3.6.5 Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas utilizando-se o kit Proteínas Totais (Labtest<sup>®</sup>, Vista Alegre, Brasil). No qual, o princípio dessa metodologia está na reação entre o íon cobre do reagente biureto, que reage em contato com as ligações peptídicas da proteína, produzindo uma cor púrpura, a qual deve fazer a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro.

## 3.7 ESTUDO MOLECULAR

### 3.7.1 Extração de RNA total dos explantes

Os explantes nos tempos D0, D2, D4 e D6 foram retirados da cultura e imediatamente transferidos para microtubo contendo 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> Reagente e levados para freezer -80°C, onde foram mantidos até o processamento da análise molecular.

Para o processamento da amostra e extração de RNA, todo material utilizado foi lavado com água DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma-Aldrich, cat.: D5758) ativa, seguida por água DEPC inativa (inativação realizada por autoclavagem). Utilizou-se homogeneizador de tecido (Tissue Homogenizer Omni TH<sup>®</sup>) com probe serrilhada de 7mm para a maceração de todos os fragmentos, sendo que a cada fragmento macerado a probe foi limpa com álcool 70%, seguida de água DEPC ativa e por último, água DEPC inativa, além disso, a maceração ocorreu por divisão dos grupos (controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm) que aconteceu em dias diferentes para evitar contaminação entre grupos. Cada fragmento foi dividido em duas partes e cada parte macerada em 1mL de TRIzol<sup>®</sup> na velocidade máxima do homogeneizador, este operando a 35.000 rpm, o tubo contendo o explante foi mantido imerso no gelo para evitar aquecimento da amostra durante todo o período da maceração. Após finalizar a maceração realizou-se a próxima etapa da extração de RNA.

Na etapa seguinte cada microtubo contendo 1 mL de macerado recebeu 200 µL de clorofórmio (J.T Baker. Cat.: 9180-02) gelado e foi misturado com intensa agitação manual por 15 seg, seguido por centrifugação a 12000 rpm, à 4°C, por 15 min. Após a centrifugação a fase aquosa, parte superior, foi transferida para um novo microtubo, e a ele adicionado 500µL de isopropanol gelado. Este microtubo foi mantido em -80°C por aproximadamente 24h para precipitação do RNA.

No dia seguinte, as amostras que permaneceram por 24h no  $-80^{\circ}\text{C}$  para precipitação do RNA foram centrifugadas a 12000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 min, o sobrenadante descartado e o pellet resultante lavado com 1 mL de álcool 75% gelado, com centrifugação a 7500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min. O sobrenadante então foi retirado e o microtubo foi mantido invertido em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 min, para secagem do pellet de RNA, após seco foi eluído em 15  $\mu\text{L}$  de água DEPC inativa. O RNA extraído foi acondicionado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ao final, foram obtidos 2 tubos por amostra, cada um com volume de 15  $\mu\text{L}$ , que após eluição juntou-se originando 1 tubo com 30  $\mu\text{L}$  por amostra.

### 3.7.2 Quantificação e avaliação de integridade do RNA

Ao final do processamento das fases supracitadas, o RNA foi quantificado em NanoVue<sup>®</sup> Plus (GE Healthcare Life Sciences) usando 2  $\mu\text{L}$  das amostras. Além da quantificação em  $\text{ng}/\mu\text{L}$  foram obtidas as razões 260/280, 230/280. Para definir quantidade total de RNA por fragmento, após obter a quantificação, dada em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , o valor foi multiplicado pelo volume total de cada amostra. O gel de agarose, para avaliar a integridade do RNA, foi realizado para algumas amostras aleatórias das 3 peles, analisando deste modo amostras de diferentes grupos e em tempos variados de cultura. O gel foi confeccionado a 1,5%, utilizando 300 ng de cada RNA + 2  $\mu\text{L}$  de xileno cianol + 1  $\mu\text{L}$  de gel red, a eletroforese aconteceu sob 70 V, por 1 hora. E o resultado foi conferido em transluminador de luz UV.

### 3.7.3 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Nessa fase o RNA foi tratado com enzima DNase para garantir que a amostra de RNA não estivesse contaminada com DNA. Seguiu-se o protocolo da bula do kit RQ1 RNase-Free DNase adaptado (Promega, USA), para cada 1000ng de RNA 2 unidades de enzima foi utilizada, após homogeneização por pipetagem da amostra com a enzima e o tampão, o tubo foi incubado por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , após esta incubação cada amostra recebeu 2  $\mu\text{L}$  de solução stop, e foi incubado novamente por 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$ .

Após tratamento com DNase as amostras foram quantificadas novamente em Nanovue<sup>®</sup>, e 500 ng do RNA foi utilizado para síntese de cDNA, seguindo orientações do kit GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcriptase System (Promega, USA), os 500 ng de RNA foram inicialmente incubados com 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT Primers, em um volume final de 5  $\mu\text{L}$ , à temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 min, a este foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de mix contendo 4  $\mu\text{L}$  de

tampão [5x], 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 1 µL de mix de nucleotídeos [10 mM], 0,5 µL de RNasin [40 u/µL], 1 µL de Transcriptase Reversa, e 6,1 µL de água Nuclease-free, após homogeneização por pipetagem o tubo foi incubado a 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 hora e 70 °C por 15 min.

Todas as etapas de incubação foram realizadas em termociclador T100 thermal cycler da Bio-Rad (BioRad Laboratories, USA. Cat.: 1861096).

### 3.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de cDNA foram submetidas a Real- Time PCR com *primers* para a região dos alvos humanos β-actina (ACTB), colágeno tipo I (COL1A1), colágeno tipo III (COL3A1), metaloproteinase-1 (MMP1) e ciclina D1 (CCND1). As sequências de cada *primer* utilizado são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de *primers* usados para amplificação de cDNA

Alvo	Sequência	TM	Referência
<b>β -actina</b>	CCCAGCCATGTACGTTGCTA TCACCGGAGTCCATCACGAT	83°C	NYSTRÖM et al, 2004
<b>COL1A1</b>	CGATGGATTCCAGTTCGAGT TTTTGAGGGGGTTCAGTTTG	ND	LIU et al, 2018
<b>COL3A1</b>	GACTGCCACGTTACCTTTG CTGGTGCTCCTGGACAGAAT	86°C	DERDERIANet al, 2005
<b>MMP1</b>	GCTGAAAGTGACTGGGAAACC TGCTCTTGGCAAATCTGGCGTG	84°C	WANG et al, 2015
<b>CCND1</b>	CTGTCCCACTCCTACGATACG CAGCATCTCATAAACAGGTCCTACTAC	75,5°C	ZHAO et al, 2016

As reações foram realizadas com Master Mix SYBR Green (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, USA), a amostra foi misturada com 12,5 µL de Master Mix [2x], 0,5 µL de cada *primer* [10 µM ] e 6,5 µL de água nuclease-free. As amostras de cDNA foram testadas para os alvos β- actina, COL1A1, COL3A1, MMP-1 e CCND1 em duplicata, na diluição de [1:3] com

volume 5  $\mu$ L, em que, a melhor concentração dos *primers* e das amostras foram definidas após a realização de alguns testes prévios.

A reação de PCR foi realizada no termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (BioRad, sistema CFX96™ Touch, EUA. Cat.: 184-5096) com os protocolos de ciclagem mostrados na tabela 3, seguida pela curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 55°C a 95°C.

Tabela 3 - Protocolo de ciclagem para cada par de *primer*

<i>Alvo</i>	<i>Ciclagem</i>
<b>B- actina</b>	95°C por 2 min; 45 ciclos de 95°C por 5 seg, 60°C por 10 seg e 72°C por 20 seg; e uma etapa à 72°C por 20 seg.
<b>COL1A1</b>	95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 5 seg, 56°C por 10 seg e 72°C por 20 seg; e uma etapa à 72°C por 20 seg.
<b>COL3A1</b>	95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 5 seg, 56°C por 10 seg e 72°C por 20 seg; e uma etapa à 72°C por 20 seg.
<b>MMP-1</b>	95°C por 2 min; 40 ciclos de 94°C por 5 seg, 63°C por 10 seg e 72°C por 20 seg; e uma etapa à 72°C por 20 seg.
<b>CCND1</b>	95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 5 seg, 62°C por 10 seg e 72°C por 20 seg; e uma etapa à 72°C por 20 seg.

Em todas as reações foram usados os controles:

- Branco – apenas reagentes sem amostra;
- Controle positivo – cDNA das amostras do experimento de salina (Pool)
- NT (no template) – tubo com todos reagentes da reação de PCR exceto amostra de cDNA;
- NRT (no reverse transcriptase) – tubo com todos os reagentes da reação de PCR e amostra de RNA que na etapa de síntese de cDNA foi incubado com todos os reagentes da síntese exceto a enzima transcriptase;

Após o término da reação o arquivo gerado foi exportado para *pen drive* e analisado no software do aparelho termociclador (Bio-Rad CFX Manager 2.1. 1022.05.23), o threshold ajustado e os cycle threshold (CT) das amostras determinados, a amplificação foi considerada

positiva quando apresentava curva de amplificação abaixo do cT 40 e com TM (temperatura de *melting*) igual ao controle.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0, usando One-Way ANOVA seguida por Teste de Tukey, para as comparações entre todos os grupos com intervalo de confiança de 95% e os valores de p significantes foram: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ,

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 para a confecção dos gráficos.



# 4 RESULTADOS

“O que prevemos raramente ocorre, o que menos esperamos geralmente acontece”  
Benjamin Disraeli

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PELE DOS DOADORES

A pele utilizada nos experimentos foi obtida de cirurgias eletivas provenientes da abdominoplastia. Sendo utilizado no total 3 doadores, todos do sexo feminino, brancas, com idades entre 36 a 41 anos, obtendo a idade média de 38 anos entre as doadoras.

🚦 Pele 1 - 41 anos; Pele 2 - 38 anos; Pele 3 - 36 anos.

## 4.2 ANÁLISE DOS EXPLANTES DE PELE

A análise microscópica consiste na observação clínica do tecido, com a finalidade de detectar possíveis alterações ou lesões das amostras em estudo. Nesse estudo, os explantes de pele permaneceram com aparência normal durante todo o período do cultivo tecidual.

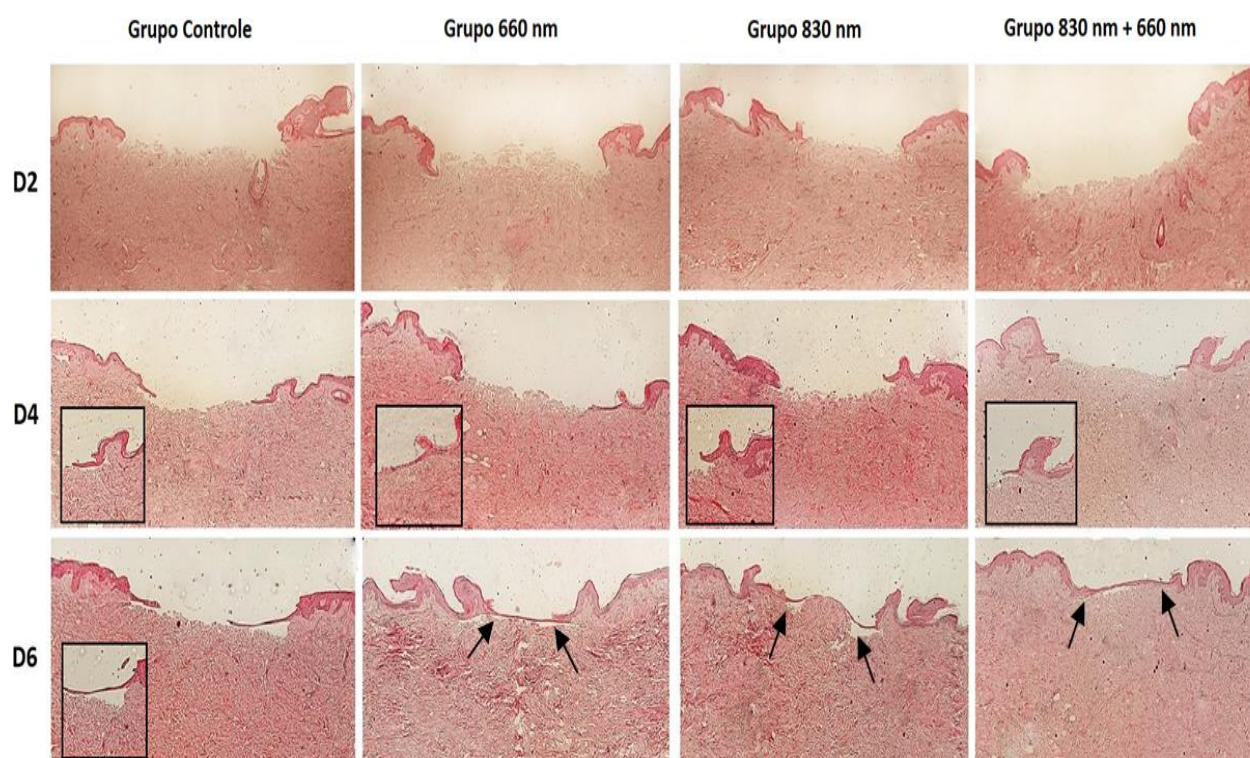
Por meio da coloração de hematoxilina e eosina (HE) foi possível notar que a estrutura tecidual ao longo do período de observação, se manteve igual ao início da cultura. As camadas da epiderme estavam todas mantidas, com preservação da junção dermo-epidérmica, sem alterações no número das papilas dérmicas, além da manutenção da espessura epidérmica.

Ainda do ponto de vista histológico, foi possível analisar o comportamento das úlceras ao longo da cultura (D2, D4, D6), averiguando a migração/proliferação celular na camada basal (Figura 11). Ambos os fragmentos do grupo controle e dos grupos que sofreram a intervenção do laser tiveram comportamentos similares, foi possível observar a epitelização, marcada pela migração/proliferação dos queratinócitos que ocorreu na direção da região das bordas da ferida para o centro da lesão.

Ao final do período de cultivo (6 dias), o fechamento completo da úlcera pela camada de novos queratinócitos foi observado em aproximadamente 20% dos fragmentos que receberam o laser.

No grupo controle, por sua vez, foi observado migração/proliferação dos queratinócitos em todos os fragmentos, porém sem fechamento completo em nenhuma úlcera.

Figura 11 - Histomorfologia dos explantes



Comparação representativa dos cortes histológicos da pele 3, corado pela hematoxilina e eosina (HE). Ampliação em objetiva de 5x. Nas colunas, da esquerda pra direita, estão os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm e nas linhas estão dispostos os tempos em cultura: D2, D4 e D6. As imagens foram obtidas por um *smartphone* acoplado ao microscópio, com a finalidade de capturar imagem da região da úlcera panoramicamente. As setas demonstram o fechamento completo da úlcera nos grupos tratados.

### 4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

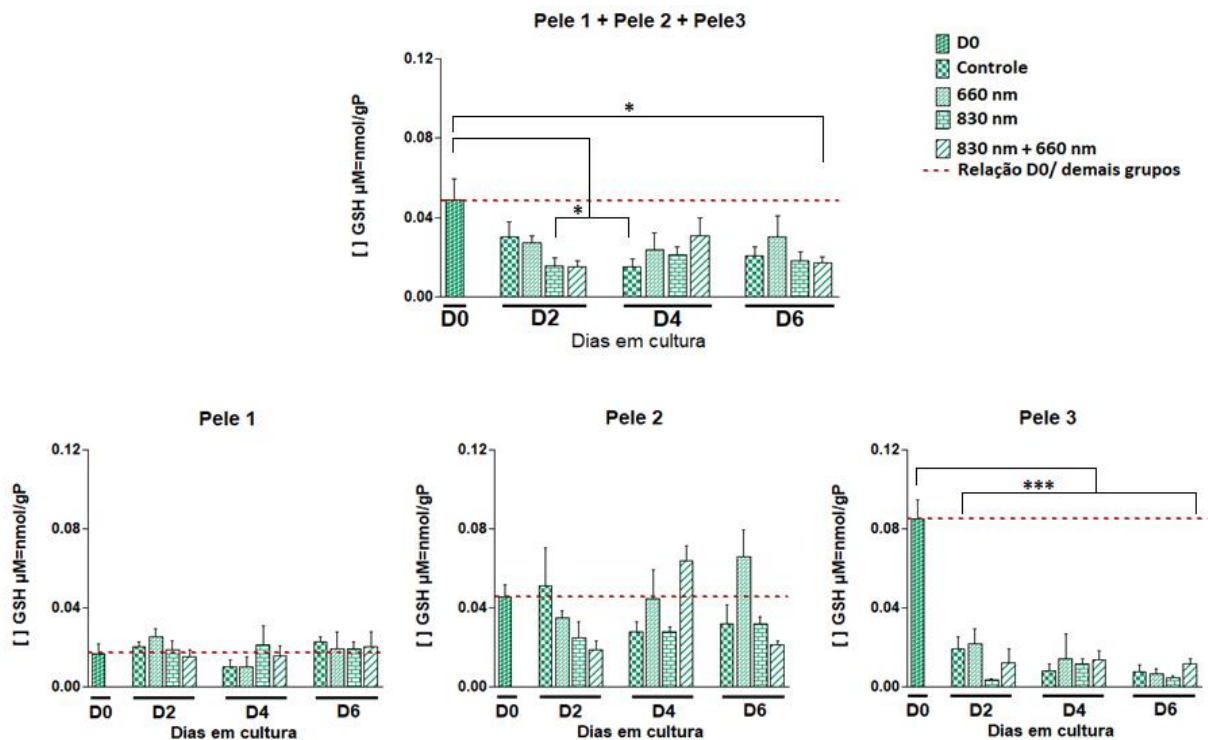
#### 4.3.1 Defesas Antioxidantes

##### 4.3.1.1 Glutationa Reduzida - GSH

Quando se analisa os valores das 3 peles juntas o nível de GSH permaneceu semelhante entre os diferentes grupos de intervenção (Figura 12), porém foi possível observar uma queda expressiva dos níveis de GSH especialmente nos grupos 830 nm e 830 nm + 660 nm (dia 2), controle (dia 4) e 830 nm + 660 nm (dia 6) em relação ao tempo D0.

Ao analisar isoladamente as peles, a Pele 1 dentre as 3 foi a que apresentou maior estabilidade na concentração de GSH entre os grupos e ao longo do tempo comparando aos controles; já a Pele 2 apresentou maior heterogeneidade entre os grupos e ao longo do tempo em cultura observou-se que o nível de GSH no dia 2 foi se reduzindo nos diferentes grupos: Controle > 660 nm > 830 nm > 830 nm+660 nm, no dia 4 nos grupos 660 nm e 830 nm+660 nm o nível se elevou, e no dia 6 o grupo 660 nm manteve-se mais elevado porém no grupo 830 nm+660 nm houve redução. Por sua vez, a Pele 3 obteve em todos os grupos ao longo do tempo uma queda considerável dos níveis expressos de GSH quando comparado ao tempo inicial (D0).

Figura 12 - Quantificação de GSH



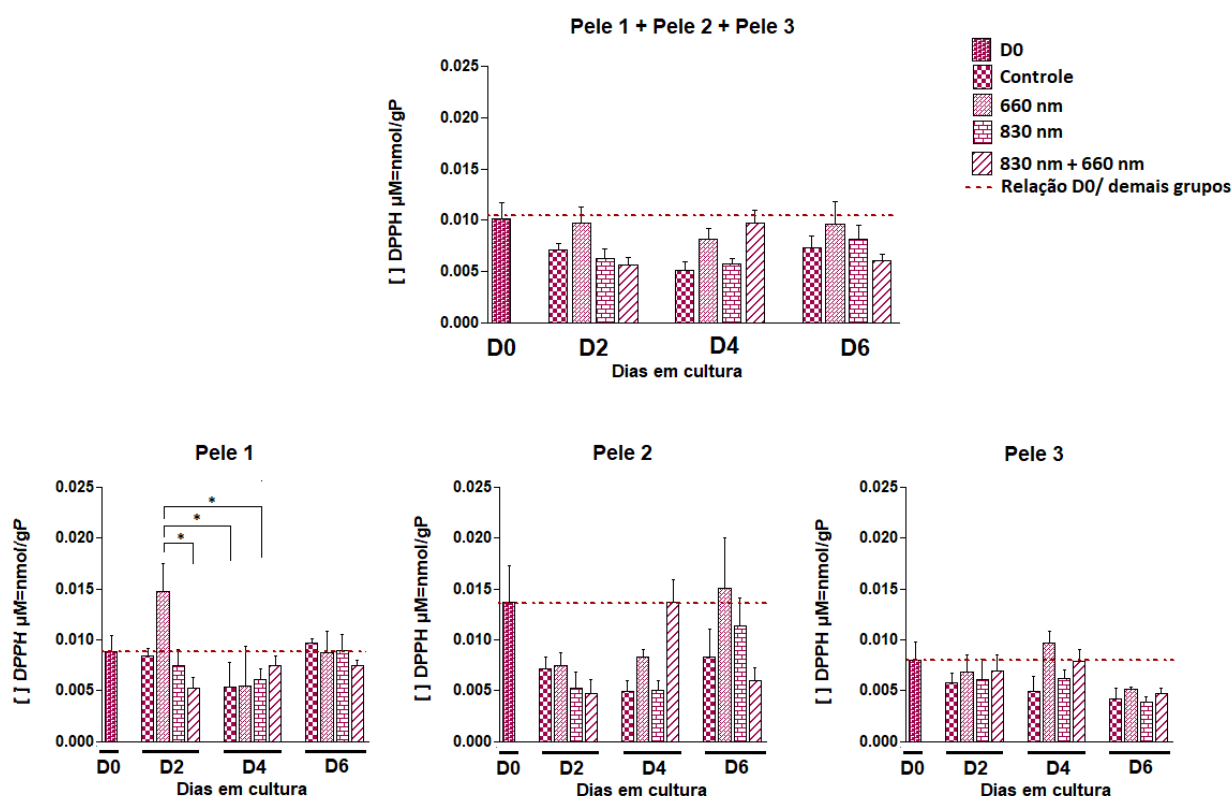
Dosagem dos níveis de concentração de GSH nos explantes de pele dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm, separados por pele ao longo dos tempos em análise (D0, D2, D4, D6). Valores dados por µM=nmol/gP.

#### 4.3.1.2 Radical 2,2 difenil- 1- picrilhidrazil – DPPH

Para o ensaio de DPPH, no qual se analisa a capacidade da amostra em eliminar antioxidantes constatou-se que os resultados se demonstraram similares ao GSH, o que é possível observá-lo na Figura 13. Estaticamente não houve diferenças no nível de dosagem ao longo do tempo para nenhum grupo e nenhuma pele quando analisados juntamente.

Contudo a Pele 1 obteve diferenças estatísticas do grupo 660 nm (dia 2) em relação aos grupos 830 nm + 660 nm (dia 2), controle e 830 nm, ambos dia 4, tendo o maior nível de DPPH, os demais ficaram semelhantes ao controle D0. Os explantes da Pele 2 do grupo 830 nm + 660 nm no dia 4 e do grupo 660 nm no dia 6 seguiram os padrões do GSH, expressando também os maiores níveis de concentrações de DPPH. Já a pele 3 apresentou maior estabilidade entre os grupos e tempos apenas com uma redução em todos os grupos no dia 6.

Figura 13 - Quantificação de DPPH



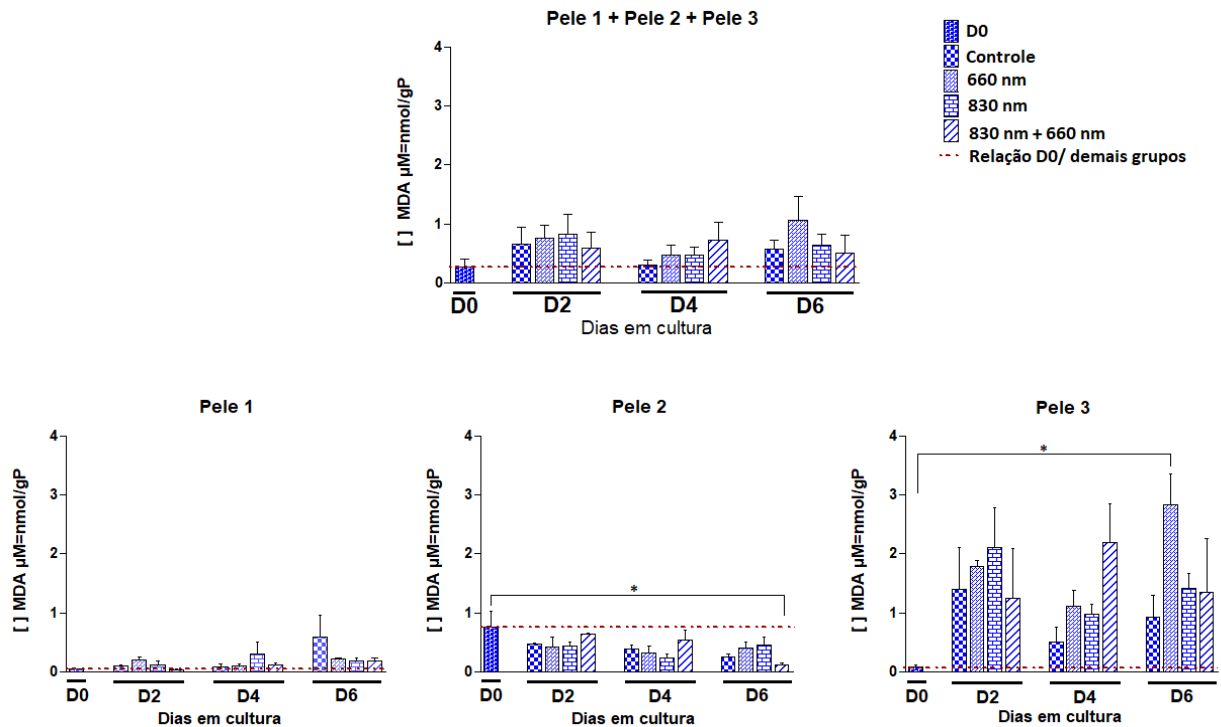
Dosagem dos níveis de concentração de DPPH nos explantes de pele dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm, separados por pele ao longo dos tempos em análise (D0, D2, D4, D6). Valores dados por  $\mu\text{M}=\text{nmol/gP}$ .

### 4.3.2 Estresse Oxidativo

#### 4.3.2.1 Malondialdeído- MDA

Para os valores dosados de MDA não houve diferença entre os grupos e as 3 peles em análise, porém foi possível observar que isoladamente a pele 3 em todos os dias de cultivo obteve níveis mais elevados quando comparado as peles 1 e 2 que demonstraram valores mais próximos uma da outra (Figura 14).

Figura 14 - Quantificação de MDA



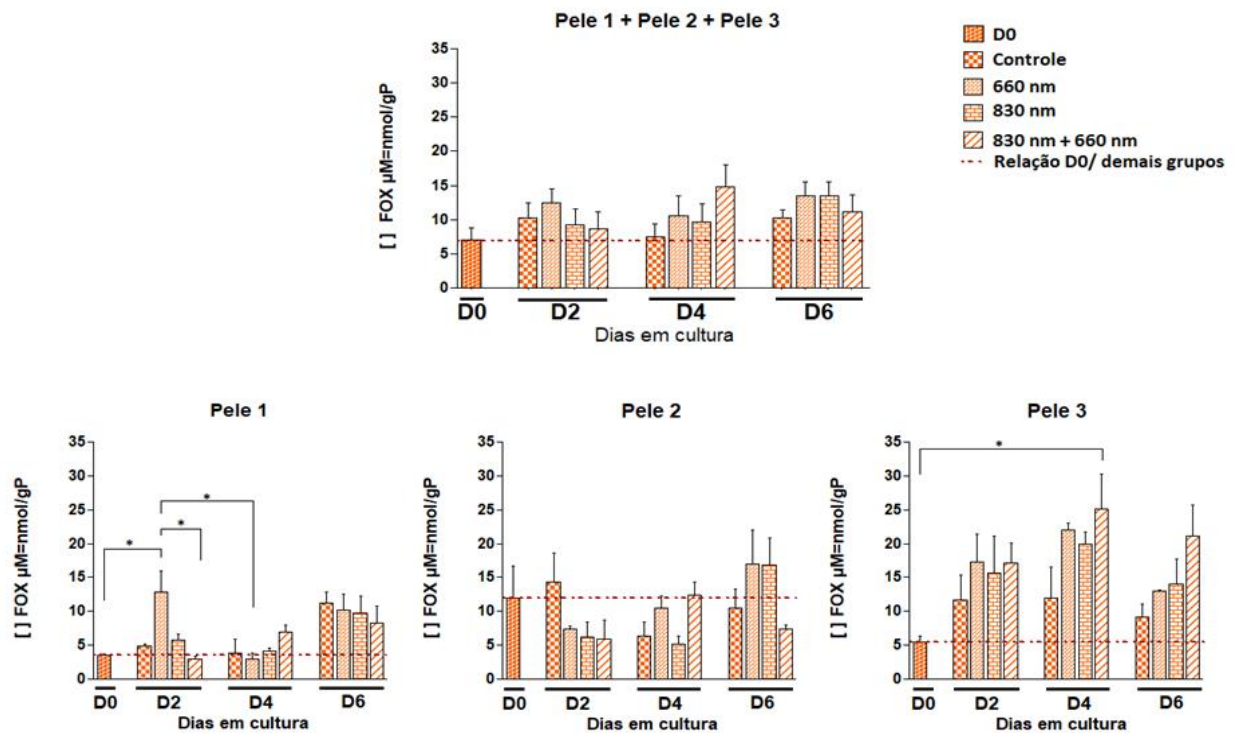
Dosagem dos níveis de concentração de MDA nos explantes de pele dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm, separados por pele ao longo dos tempos em análise (D0, D2, D4, D6). Valores dados por  $\mu\text{M}=\text{nmol/gP}$ . Para efeito de comparação entre as peles, foi realizada uma normalização da pele 3, sendo dividido cada valor das respectivas amostras por 10.

#### 4.3.2.2 Hidroperóxidos - FOX

Assim como no MDA, os resultados do FOX não apresentaram diferença estatística entre os grupos de intervenção, nem entre as 3 peles em análise.

Entretanto analisando isoladamente, a pele 1 apresentou níveis menores em relação as peles 2 e 3, e a pele 3 os maiores níveis (Figura 15). É possível constatar que nas peles 1 e 2, no dia 6 os níveis de FOX foram um pouco mais elevados quando comparado com os outros dias de análise, já na pele 3, o dia 2 e o dia 4 apresentou as maiores dosagens de FOX.

Figura 15 - Quantificação de FOX



Dosagem dos níveis de concentração de FOX nos explantes de pele dos grupos controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm, separados por pele ao longo dos tempos em análise (D0, D2, D4, D6). Valores dados por  $\mu\text{M}=\text{nmol/gP}$ . Para efeito de comparação entre as peles, foi realizada uma normalização da pele 1, sendo multiplicado cada valor das respectivas amostras por 10.

#### 4.4 ANÁLISE MOLECULAR

##### 4.4.1 RNA

Após finalizar as extrações, as amostras foram quantificadas em Nanovue<sup>®</sup> e 93% apresentaram a razão 260/ 280 acima de 1,7 (Tabela 3). Este sendo um dado indicativo de pureza do RNA (valores mais próximos de 2,0 indicam maior pureza). Todas as amostras desse estudo foram utilizadas para as etapas subsequentes.

Para checar a qualidade/integridade do RNA foi realizado o gel de agarose com algumas amostras aleatórias das 3 peles, portanto analisou-se amostras de diferentes grupos e em tempos variados de cultura, todas as amostras avaliadas apresentaram as bandas referentes ao 18S e 28S RNA ribossomal humano, indicando integridade do RNA extraído.

Tabela 4 - Razão entre as absorvâncias 260/ 280 das amostras de RNA

<b>Razão 260/280</b>	<b>N° de amostras Pele 1</b>	<b>N° de amostras Pele 2</b>	<b>N° de amostras Pele3</b>	<b>Total de Explantes (%)</b>
1,6	04	02	09	15 (6,55)
1,7	28	56	44	128 (55,90)
1,8	44	17	25	86 ( 37,55)
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>75</b>	<b>78</b>	<b>229 (100)</b>

Amostras de RNA extraído dos explantes. Razão das absorvâncias 260/280, obtida na quantificação pelo equipamento NanoVue<sup>®</sup>, indicativo de maior pureza, valores mais próximos de 2,0.

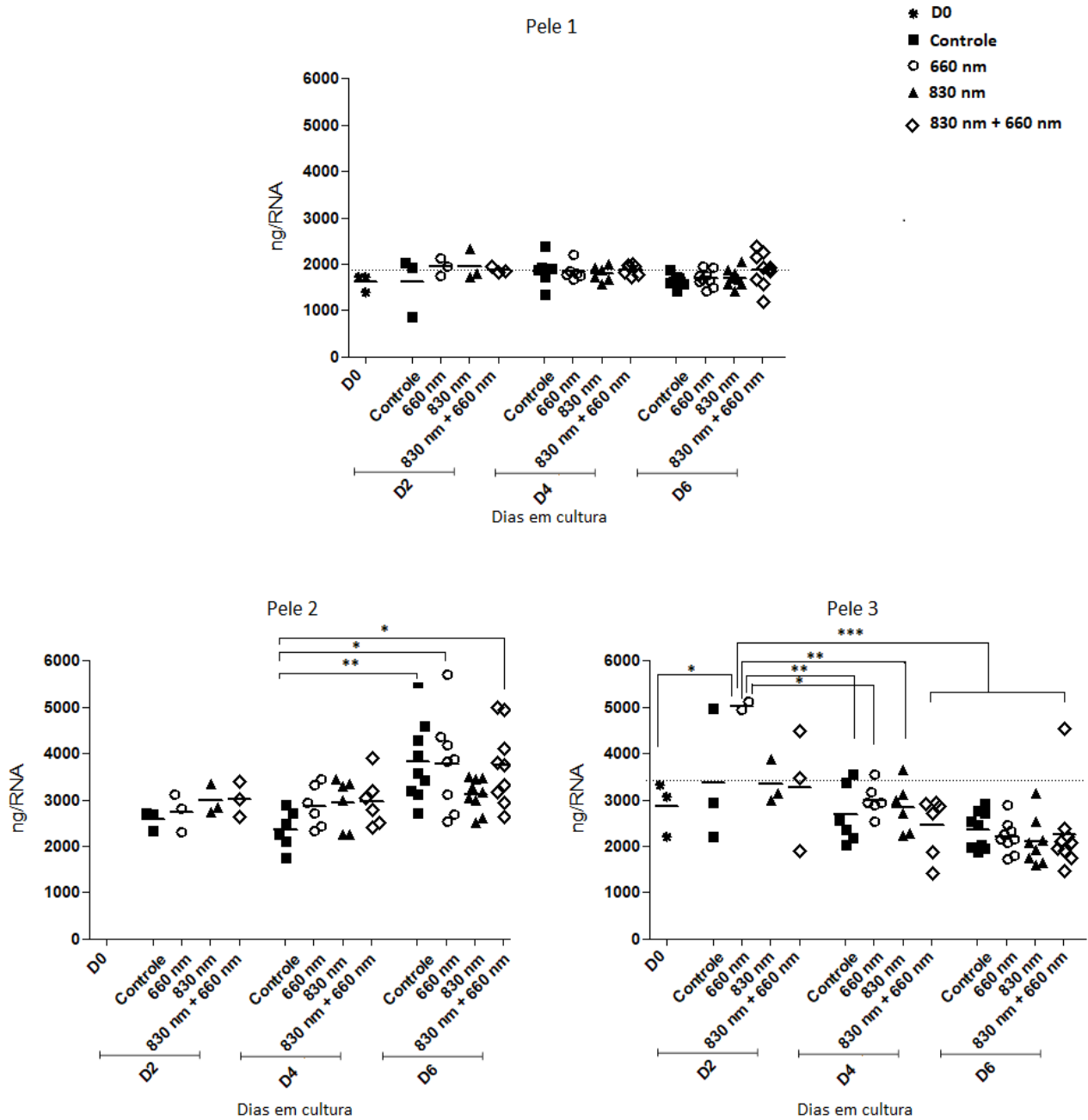
Para a quantificação, uma alíquota das amostras de RNA das peles 2 e 3, foi diluída 1/10, em decorrência da elevada concentração de RNA encontrada. Com a finalidade de que a quantificação de RNA no Nanovue<sup>®</sup> fosse mais fidedigna, ao final os valores de quantificação dessas amostras foram multiplicados por 10 para obtenção do valor real.

A concentração de RNA total ao longo do tempo foi mantida estável e de forma semelhante tanto para o grupo controle quanto para os grupos de tratamento, assim como nas diferentes peles.

Ao analisar a concentração de RNA total em nanogramas (ng), isoladamente, das diferentes peles ao longo dos tempos de cultivo e entre os grupos: controle e de tratamento, não houve diferença estatística na Pele 1, em nenhum dos pontos de análise, mantendo de forma estável ao longo da cultura. No entanto, na Pele 2 houve uma diferença estatística nos tempos D4 e D6, entre o grupo controle e os grupos: controle, 660 nm e 830 nm + 660 nm, respectivamente. Já na Pele 3, a diferença estatística ocorreu entre o grupo 660 nm em D2 quando comparado com o tempo inicial (D0) e também com os demais grupos nos tempos D4 e D6 (Figura 16).

A avaliação da quantidade total de RNA dos explantes das diferentes peles em análise demonstrou concentrações de RNA total em nanogramas semelhantes para todos os grupos, demonstrando que a intervenção da luz não influenciou na quantidade de RNA total nos explantes, e somente o tempo de cultura influenciou nesse dado.

Figura 16 - RNA total dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm



RNA total em nanogramas (ng) extraído de explantes dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm, ao longo dos dias em cultivo. \* $p < 0,05$ . \*\*\* $p < 0,001$ . Ausente explantes D0 da Pele 2.

#### 4.4.2 Expressão gênica

Foi realizado a RT-PCR com *primers* para os alvos de RNAm de colágeno do tipo 1 (COL1A1), colágeno do tipo III (COL3A1), metaloproteinase 1 (MMP1), ciclina D1 (CCND1). Os resultados são mostrados pelos valores de expressão relativa calculados pela fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  usando a  $\beta$ -actina como gene de referência.

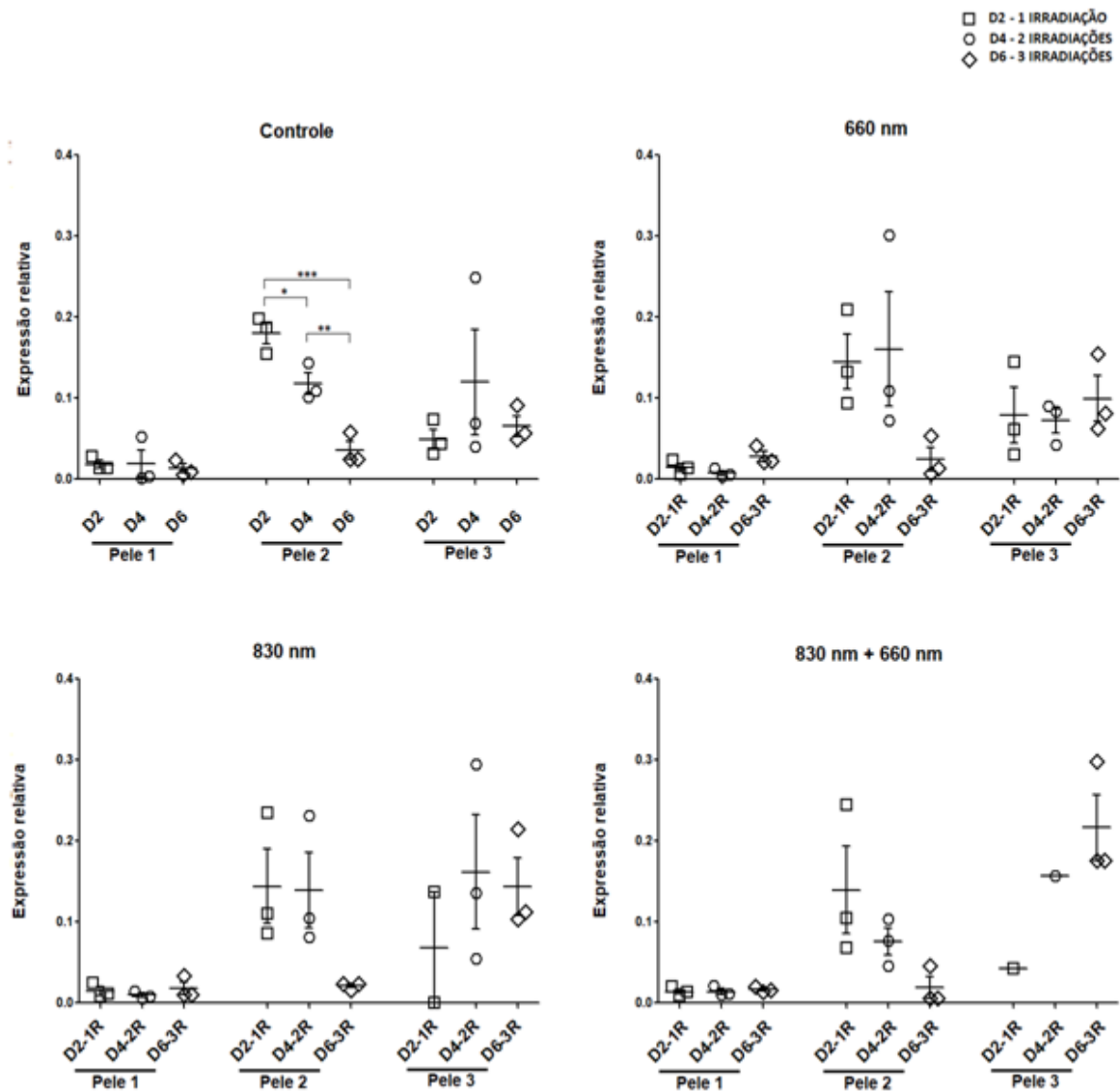


Ao final do período de cultivo os fragmentos de D4 acumularam 2 doses do laser e os fragmentos de D6, 3 doses. Com finalidade de avaliar se ao final do período de cultivo o número de doses acumuladas causaria efeito diferente, foram cultivados por 4 dias fragmentos que receberam apenas 1 dose (no dia 1) e fragmentos que receberam duas doses (no dia 1 e dia 3); e por 6 dias fragmentos que receberam 1 dose (no dia 1), 2 doses (no dia 1 e dia 3) e 3 doses (dia 1, dia 3 e dia 5). Ao final do período de cultura, estatisticamente não houve diferença na expressão gênica entre os fragmentos com doses acumuladas diferentes, para todos os alvos avaliados, sendo assim as análises que se seguiram foram realizadas nos fragmentos D2 que recebeu apenas 1 aplicação, D4 que recebeu 2 aplicações e D6 que recebeu 3 aplicações.

Nenhuma das amostras testadas para as 3 peles em estudo apresentaram amplificação detectável de COL1A1.

Se tratando do COL3A1, os valores de expressão gênica para cada explante ao longo da cultura em cada tratamento aplicado podem ser observados na figura 16, separados por pele e por grupo de tratamento ao longo do tempo de cultura e nas figuras 17, 18 e 19 separados por tempo e comparados entre os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm. No grupo controle ao longo do tempo foi possível observar diferença estatística na expressão gênica de COL3A1 apenas entre os fragmentos da pele 2 apresentando diminuição da expressão ao longo do tempo, nos demais tratamentos não houve diferença ao longo do tempo, e de forma geral mantiveram a mesma tendência que o grupo controle (figura 17).

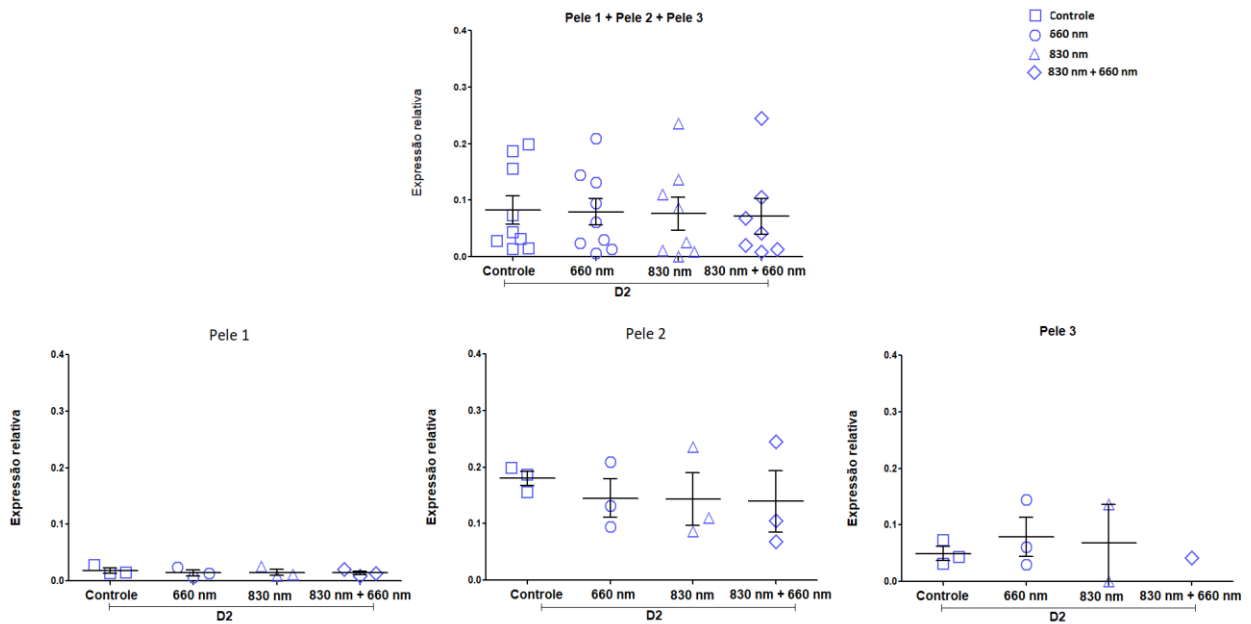
Figura 17 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo



Expressão gênica relativa do COL3A1 dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm e 660nm ao longo do tempo em cultivo D2- 1R (dia 2 com 1 irradiação), D4- 2R (dia 4 com 2 irradiações) e D6- 3R ( dia 6 com 3 irradiações) para os grupos de intervenção, calculada pelo método  $2^{-\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT- PCR, usando o gene  $\beta$ - actina como gene referência.

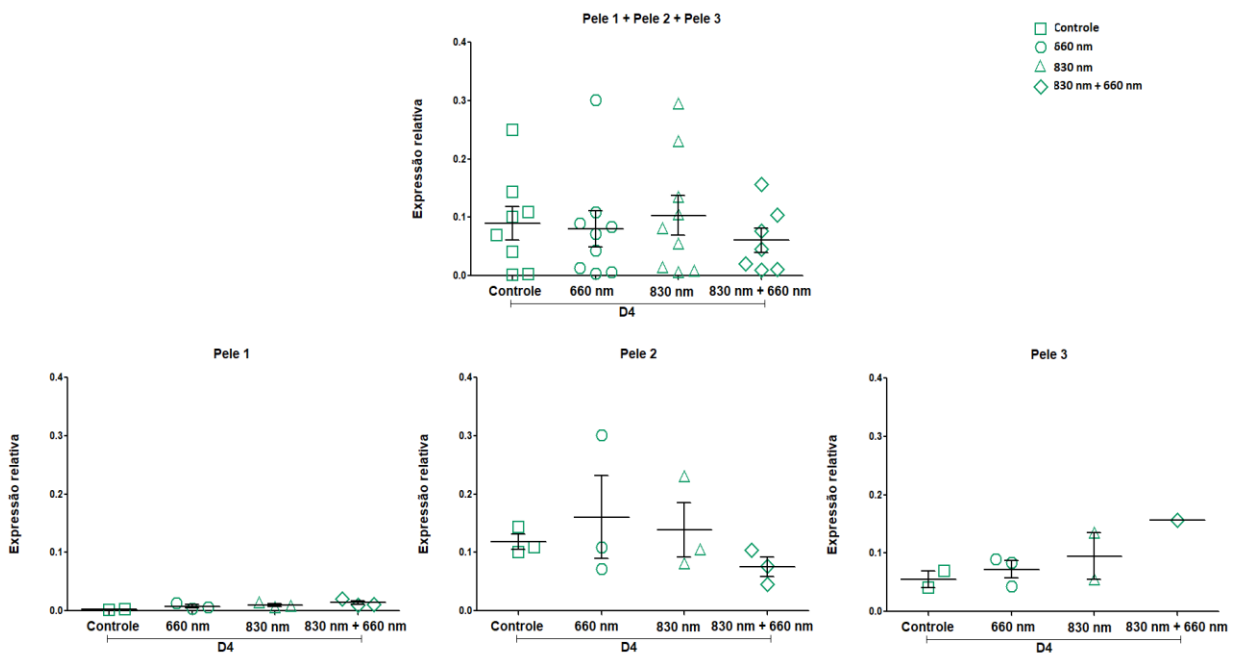
Nas figuras 18, 19 e 20 observa-se a comparação dos grupos de tratamento dentro do mesmo dia de cultura, e nota-se que houve diferença significativa na expressão gênica de COL3A1 entre os tratamentos apenas em D6 da pele 3, sendo que a expressão gênica seguiu uma tendência de aumento entre os grupos Controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm.

Figura 18 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2)



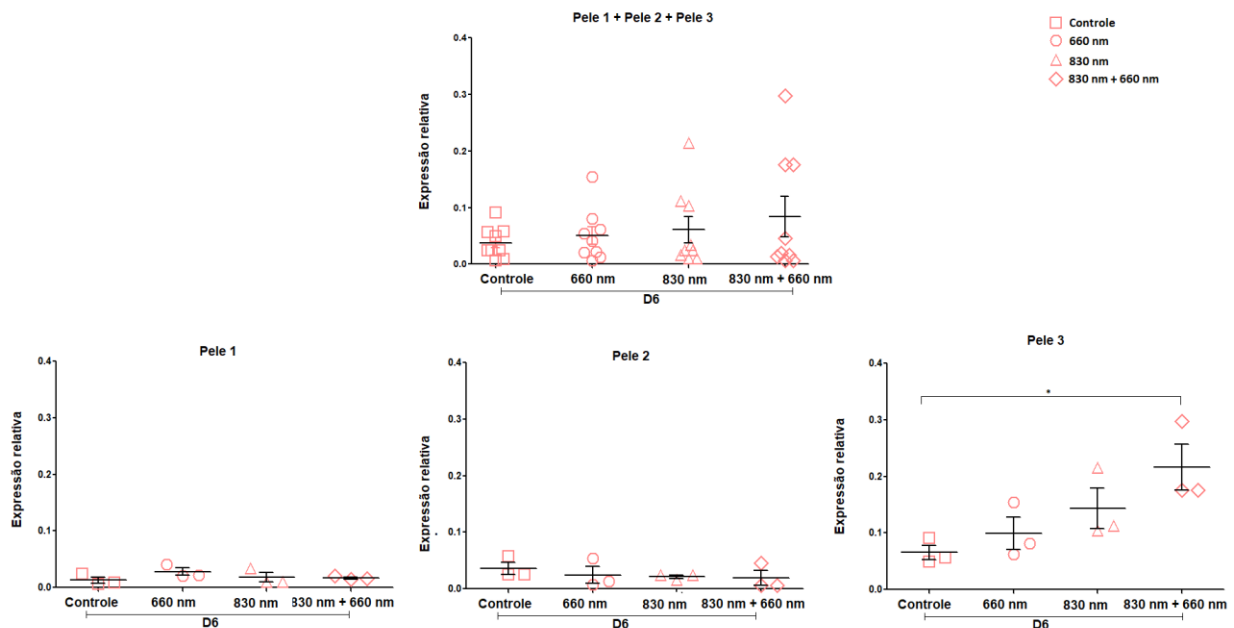
Expressão gênica relativa do COL3A1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D2 (1 irradiação), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 19 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4)



Expressão gênica relativa do COL3A1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D4 (2 irradiações), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 20 - Expressão gênica relativa do colágeno tipo III (COL3A1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6)



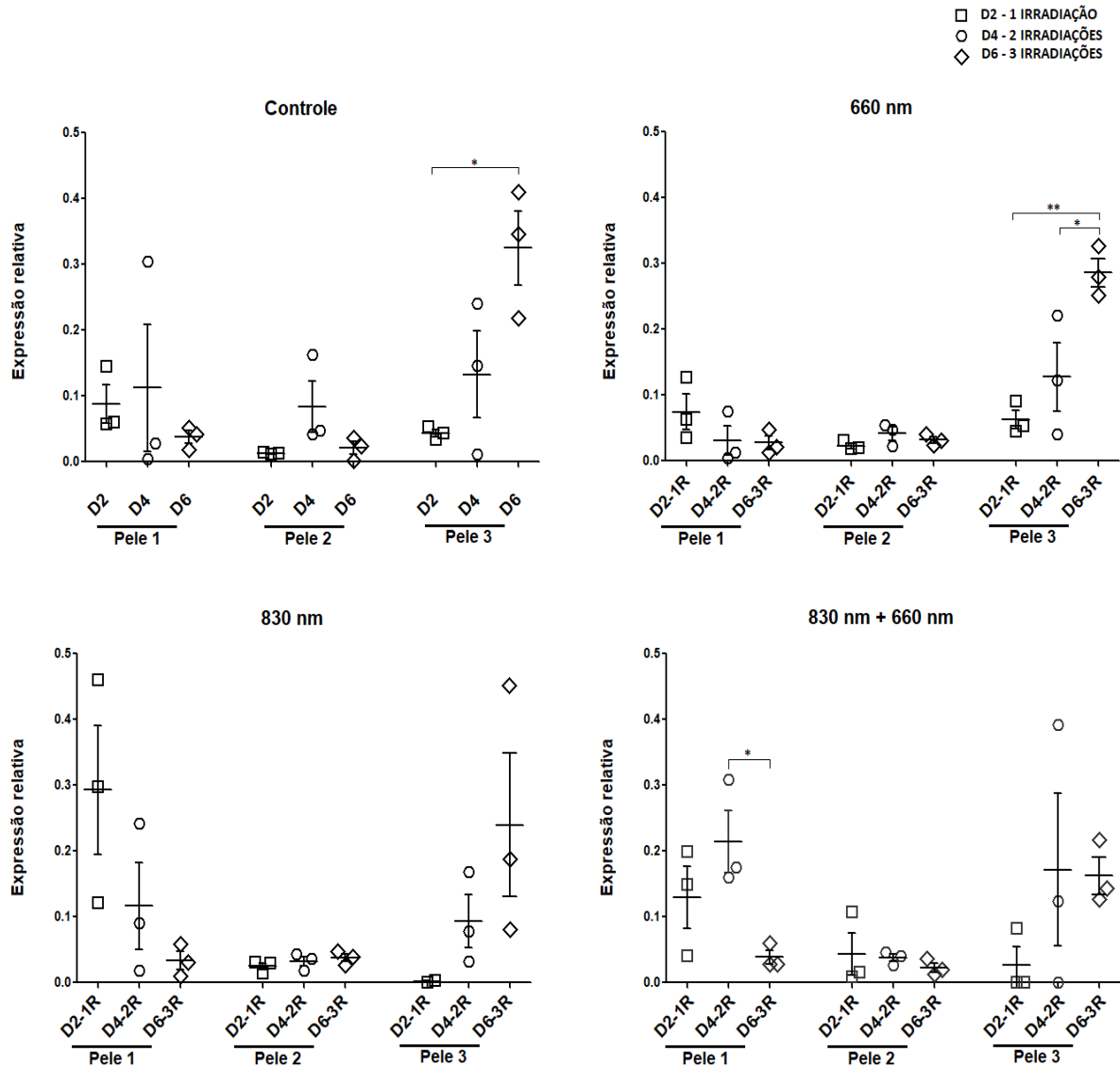
Expressão gênica relativa do COL3A1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D6 (3 irradiações), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Para o gene alvo da metaloproteinase 1 (MMP-1), os valores de expressão gênica podem ser observados na figura 21, separados por pele e por grupo de tratamento ao longo do tempo de cultura e nas figuras 22, 23 e 24 separados dentro do mesmo dia de cultura e comparados entre os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm. No grupo controle ao longo do tempo foi possível observar diferença estatística na expressão gênica de MMP-1 apenas nos fragmentos da pele 3 (figura 21), apresentando elevação dos níveis de expressão gênica ao longo do tempo.

Ainda na figura 21, foi possível observar a comparação dos grupos de tratamento ao longo da cultura, havendo uma diferença estatística na expressão gênica de MMP-1 entre os tratamentos apenas da Pele 3 para o grupo 660 nm, com aumento dos níveis ao longo do tempo, já na Pele 1 do grupo 830 nm + 660 nm também houve uma diferença estatística ao longo do tempo D4 para D6, entretanto com uma queda nos níveis de MMP-1.

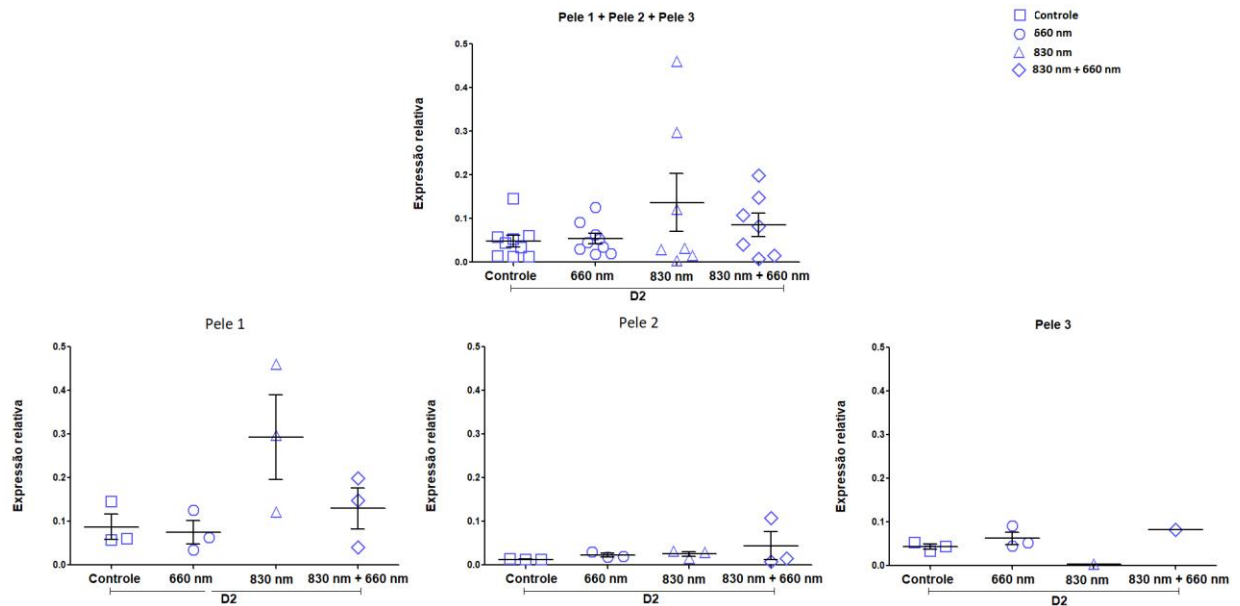
Comparando-se dentro do mesmo dia de cultura e entre todos os grupos, não houve diferença estatística na expressão gênica da MMP-1 (Figura 22, 23 e 24).

Figura 21 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo



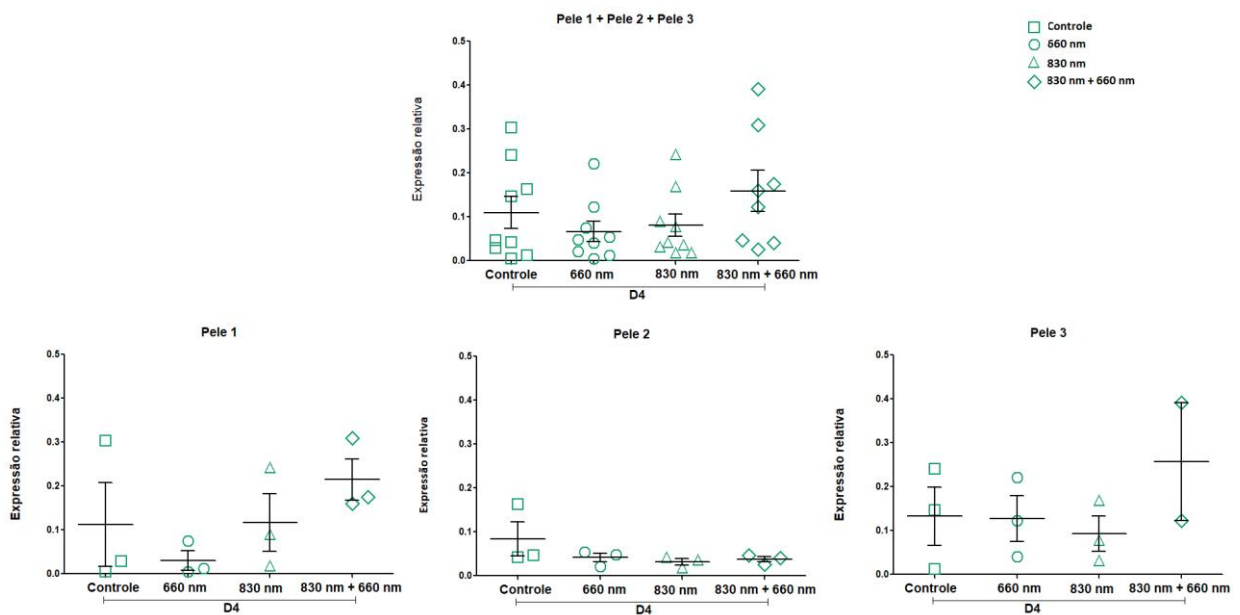
Expressão gênica relativa da MMP-1 dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm e 660nm ao longo do tempo em cultivo D2- 1R (dia 2 com 1irradiação), D4- 2R (dia 4 com 2 irradiações) e D6- 3R (dia 6 com 3 irradiações) para os grupos de intervenção, calculada pelo método  $2^{-\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT- PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência

Figura 22 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2)



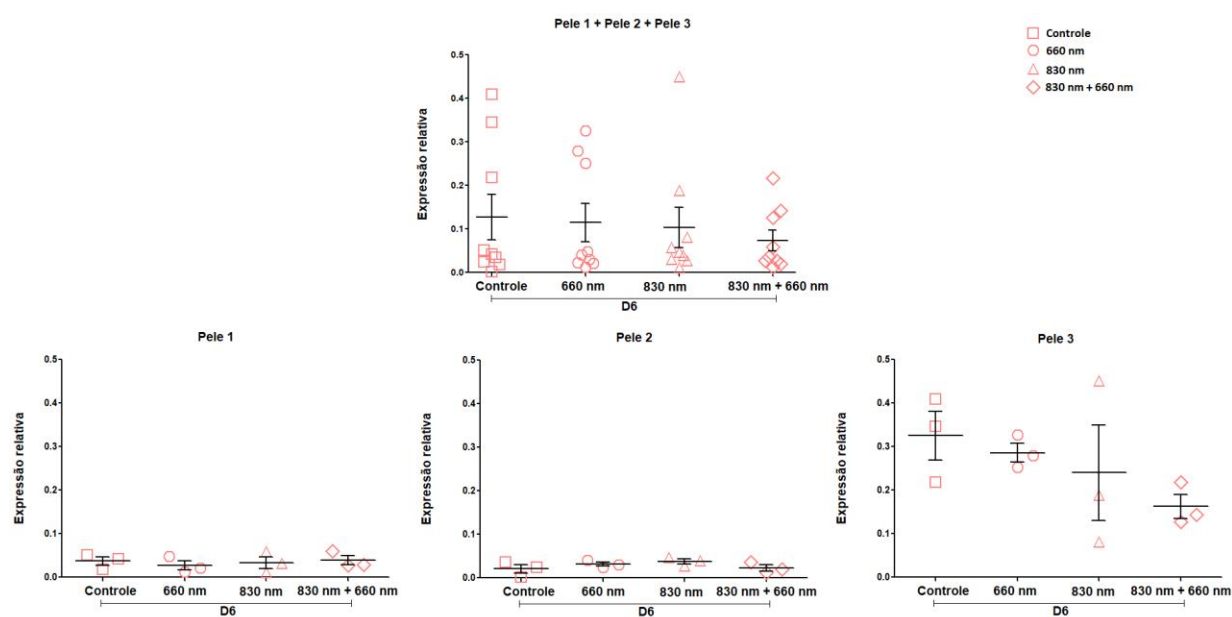
Expressão gênica relativa da MMP-1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D2 (1 irradiação), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 23 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4)



Expressão gênica relativa da MMP-1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D4 (2 irradiações), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 24 - Expressão gênica relativa da metaloproteinase 1 (MMP-1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6)



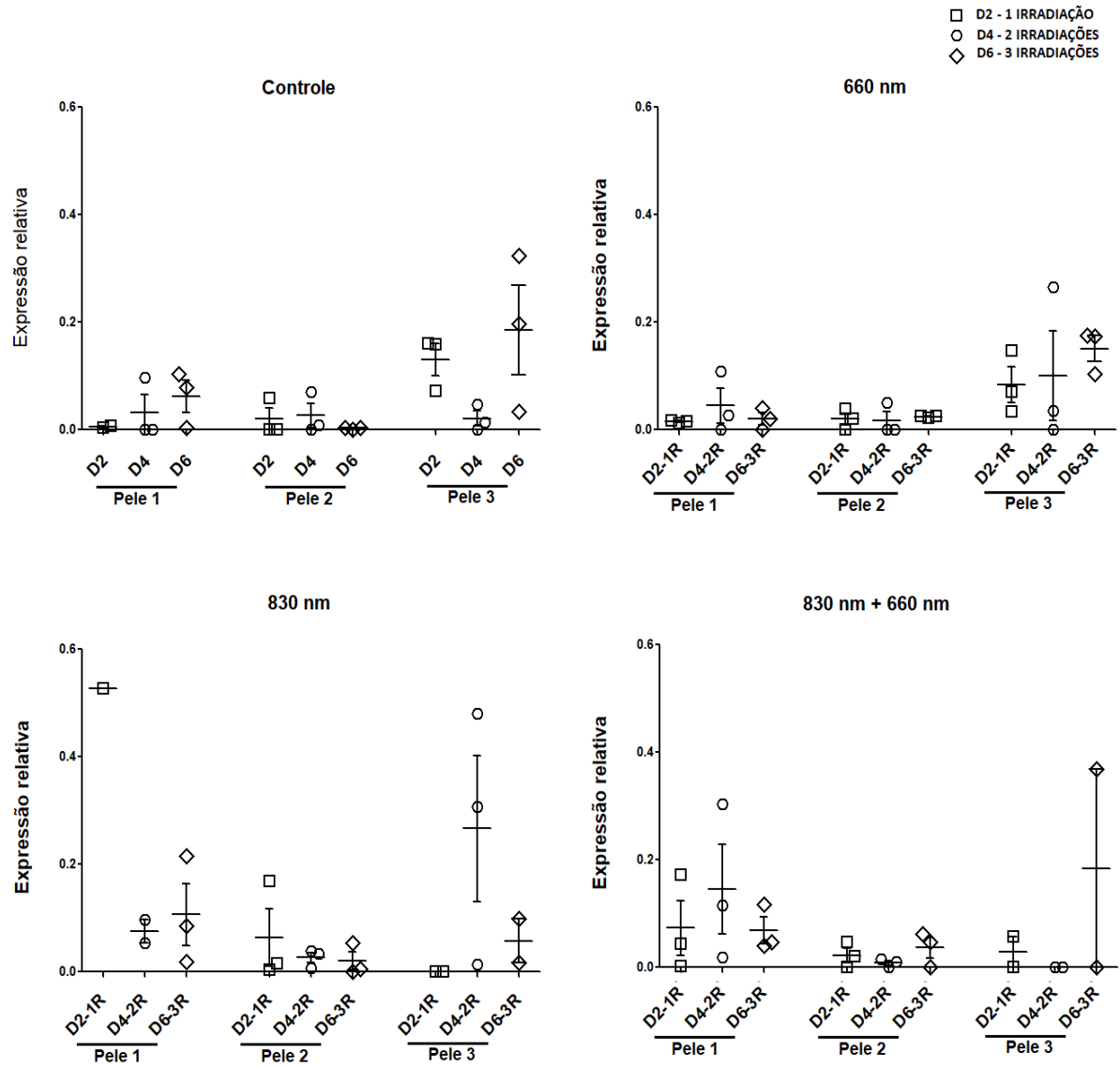
Expressão gênica relativa da MMP-1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D6 (3 irradiações), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Para o gene alvo da ciclina D1 (CCND1), os valores de expressão gênica podem ser observados na Figura 25, separados por pele e por grupo de tratamento ao longo do tempo de cultura, e nas figuras 26, 27 e 28 separados dentro do mesmo dia de cultura e comparados entre os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm. No grupo controle ao longo do tempo não foi possível observar diferença estatística na expressão gênica de CCND1, sendo que nos fragmentos da pele 3 (figura 25), os níveis de expressão gênica nos tempos D2 e D6 tiveram um leve aumento nos níveis de expressão quando comparado as demais peles nos mesmos dias.

Ainda na figura 25, foi possível observar a comparação dos grupos de tratamento ao longo da cultura, não havendo diferença estatística na expressão gênica de CCND1 para nenhuma das peles e dos grupos ao longo do tempo de cultura, e de forma geral mantiveram a mesma tendência que o grupo controle.

Comparando-se dentro do mesmo dia de cultura e entre todos os grupos, também não houve diferença estatística na expressão gênica da CCND1 (Figuras 26, 27 e 28).

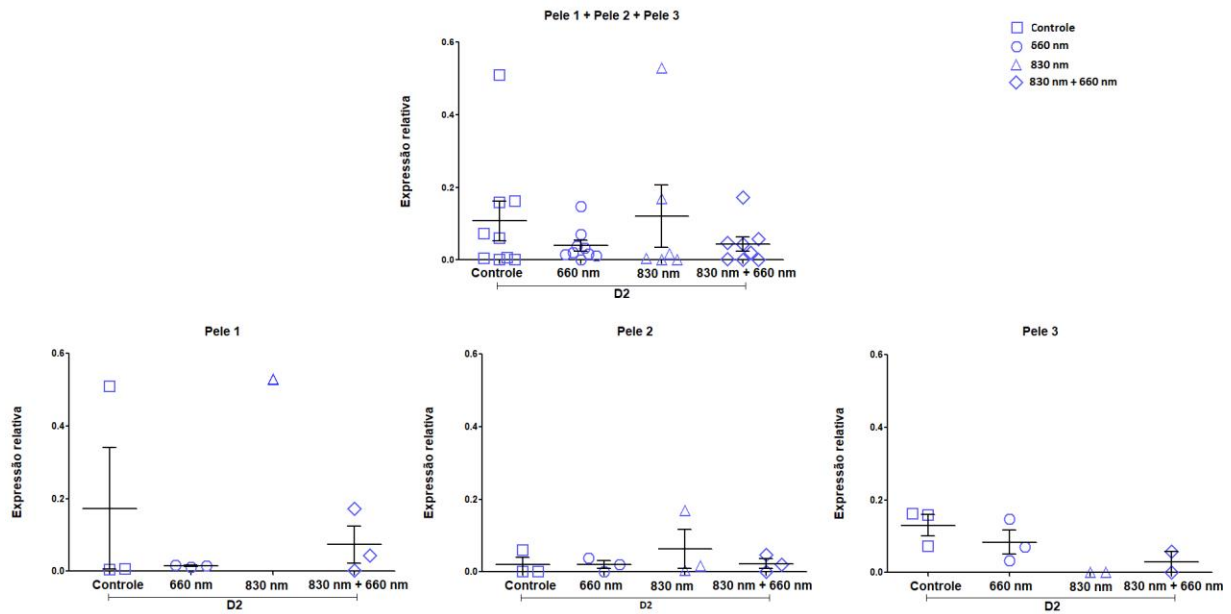
Figura 25 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), para os grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm em cada pele ao longo do tempo em cultivo



Expressão gênica relativa da CCND1 dos grupos: controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm e 660nm ao longo do tempo em cultivo D2 - 1R (dia 2 com 1 irradiação), D4 - 2R (dia 4 com 2 irradiações) e D6 - 3R (dia 6 com 3 irradiações) para os grupos de intervenção, calculada pelo método  $2^{-\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

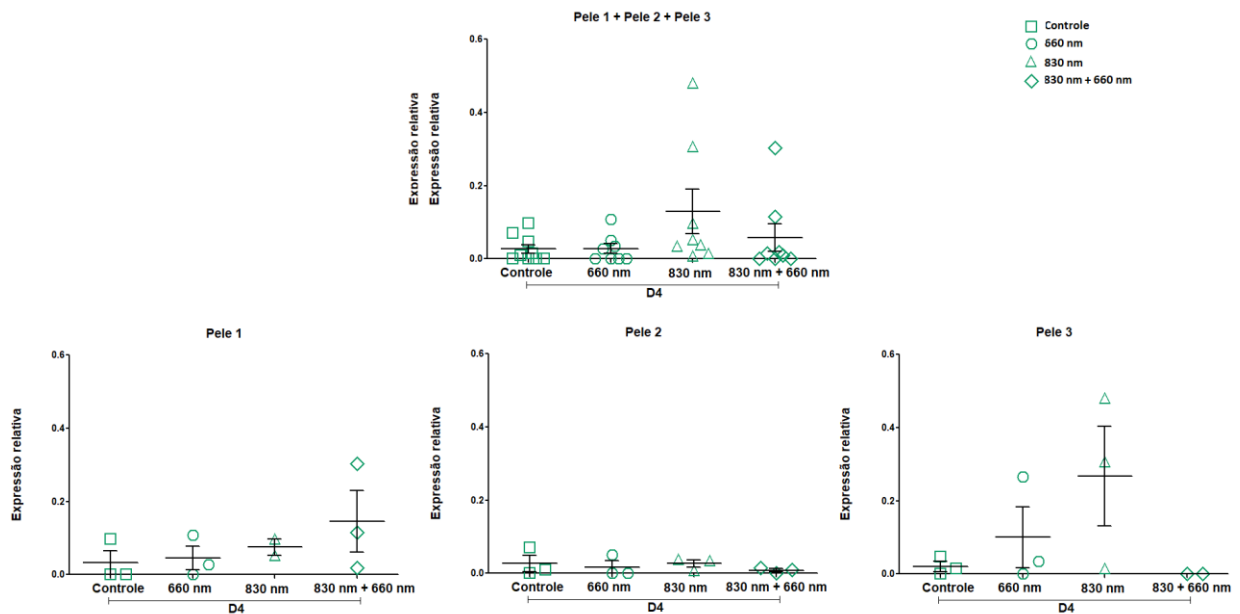


Figura 26 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D2)



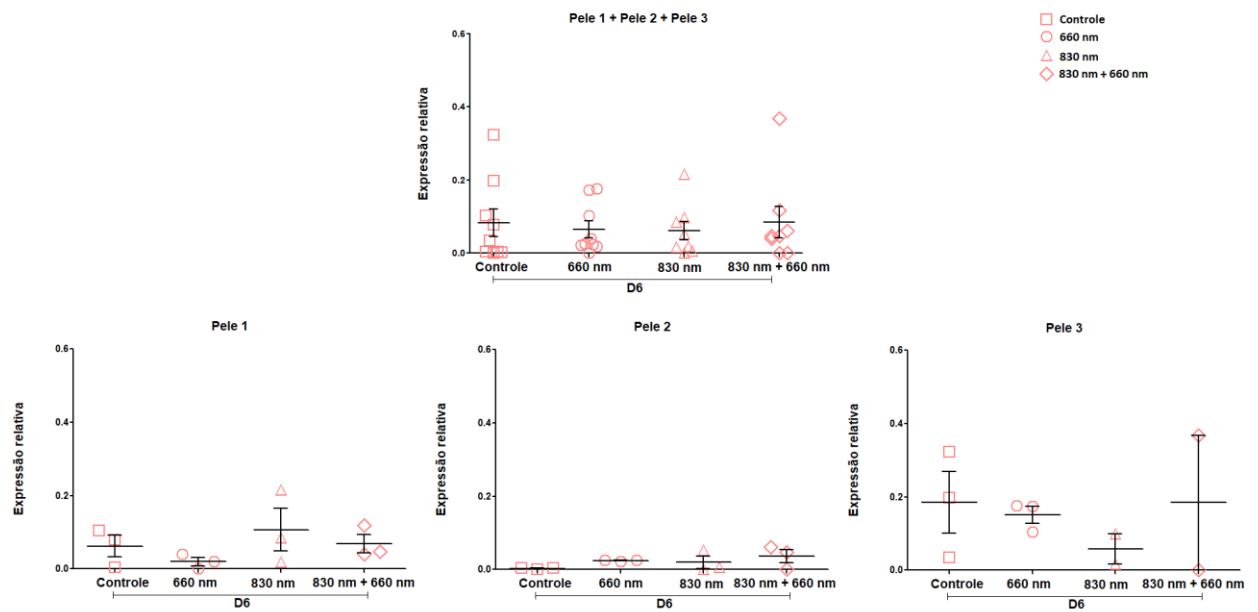
Expressão gênica relativa da CCND1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D2 (1 irradiação), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 27 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D4)



Expressão gênica relativa da CCND1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D4 (2 irradiações), calculada pelo método  $2^{\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

Figura 28 - Expressão gênica relativa de ciclina D1 (CCND1), entre todos os grupos e separado por tempo de análise (D6)



Expressão gênica relativa da CCND1 entre todos os grupos no tempo de cultivo D6 (3 irradiações), calculada pelo método  $2^{-\Delta C_T}$ , a partir de  $C_T$  obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

# 5 DISCUSSÃO

“Ninguém que algum dia deu seu melhor arrependeu-se disso”

George Halas

Vários modelos e métodos encontrados na literatura para avaliar a cicatrização de feridas crônicas têm auxiliado na compreensão do reparo tecidual, mesmo se tratando de um processo fisiológico considerado complexo, dinâmico e multifatorial por envolver uma série progressiva de eventos celulares, reações moleculares e bioquímicas (COALSON et al, 2019; WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017), o conhecimento adquirido nesses ensaios tem permitido a busca por novas técnicas e tecnologias.

Diante das limitações que cada modelo apresenta para uma perfeita compreensão da fisiopatologia do reparo cicatricial, e embora haja avanços nas terapias utilizadas no processo de cicatrização das feridas nos últimos anos, ainda há muito que ser estudado na busca por intervenções cada vez mais eficazes e que permitam acelerar o processo cicatricial aos pacientes acometidos pelas feridas crônicas de difícil prognóstico.

O modelo de cultura de explantes de pele humana, usado neste trabalho, tem sido motivo de estudo de alguns grupos de pesquisadores que veem esse método alternativo ao uso do modelo de animais (in vivo). Portanto, é um modelo promissor e que cada vez mais se fortalece, por permitir que pesquisadores estudem e analisem o comportamento da pele humana em condições ex vivo. Existem artigos que abordam o modelo de cultura de explantes de pele humana e a cicatrização de feridas (ZHANG et al, 2019; MENDOZA- GARCIA et al, 2015; XU et al, 2015), contudo nestes estudos não há abordagem da ação do laser nos diferentes comprimentos de onda, objeto do nosso trabalho.

Para início dos ensaios foi necessária padronização do modelo hOSEC, que durou aproximadamente 1 ano, até chegar ao que consideramos os melhores parâmetros, conforme descritos anteriormente. Logo, foi possível dar sequência aos experimentos e as respectivas análises. Com o propósito de melhorar as condições sob cultivo, permitindo um maior estímulo do crescimento dos queratinócitos e otimizar o modelo foi acrescentado o K-SFM ao hOSEC. O uso do meio DMEM acrescentado de 1/3 K- SFM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% L-glutamine e 1% de solução antibiótica tanto para a manutenção da cultura como para a aplicação sobre a úlcera foi escolhido por ser um meio mais indicado para as culturas de queratinócitos, já que os queratinócitos têm preferência pelo meio K-SFM em decorrência dos

fatores específicos que ele contém. Neste contexto os trabalhos desenvolvidos por Schmitt et al (2017) e Karvinen et al (2003) mostram que a presença de queratinócitos leva a produção de fatores de crescimento de queratinócitos (KGF), sendo este capaz de ativar a migração dos queratinócitos e estimular a cicatrização das feridas, ainda a expressão de KGF está associada a um melhor fechamento de feridas, além de ser considerado um importante mediador de reepitelização e cicatrização. Corroborando com estes achados Freitas e Hamblin (2016) afirma que o KGF também é o responsável pela manutenção da estrutura normal do epitélio.

O estudo em questão investigou a ação das irradiações do laser no comprimento de onda 660 nm (luz vermelha) e 830 nm (luz infravermelha), com densidade de energia de 2J nas feridas cutâneas de 3 mm em explantes de 10 mm para os grupos: 660 nm e 830 nm, e densidade de energia de 4J para o grupo 830 nm + 660 nm.

Primeiramente, observou-se a permanência dos aspectos fisiológicos em todos os fragmentos mantidos ao longo da cultura, com a morfologia da epiderme igual ao tempo inicial da cultura tecidual, em que se manteve a integridade da junção dermo-epidérmica, sem alterações no número das papilas dérmicas e manutenção da espessura epidérmica, o que vai ao encontro de Paula (2019); Andrade et al (2015); Xu et al (2012), que observaram a morfologia da epiderme mantida até 14<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias, respectivamente.

No presente estudo o processo de cicatrização das feridas foi analisado no 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias de cultura, obtendo uma migração/proliferação da região da borda da ferida em direção ao centro da lesão em todos os fragmentos em análise a partir do 4<sup>o</sup> dia. Alguns autores como Rakita et al (2020) sugerem que os queratinócitos migram/proliferam das bordas da ferida através do leito da ferida para que aconteça o fechamento da lesão. Este grupo foi capaz ainda de constatar, por meio da coloração de k14, que após a lesão tecidual, os queratinócitos estavam presentes na epiderme não lesada, porém ausentes no leito da ferida nos dias iniciais do cultivo *ex vivo*, o que corrobora com nossa observação de ausência de migração/proliferação dos queratinócitos para o leito da ferida nos dias iniciais (2<sup>o</sup> dia).

Em nosso modelo de ferida foi observado ainda que no 6<sup>o</sup> dia de cultura o grupo controle apresentou histologicamente uma expressiva migração/proliferação dos queratinócitos, embora não tenha ocorrido o fechamento completo da ferida. Por outro lado, nos grupos tratados com o laser em diferentes comprimentos de onda, alguns fragmentos apresentaram fechamento completo da ferida. Contudo, os resultados apresentaram-se aleatórios dentro as amostras, uma vez que as triplicatas em cada experimento não obtiveram o fechamento completo da ferida, na totalidade dos fragmentos, mostrando que não houve um padrão de comportamento para a restauração tecidual da lesão nesse estudo, sob as condições as quais

foram submetidas. No estudo de Rakita et al (2020) observou que no 6º dia de cultura, por meio da coloração de k14, houve o fechamento completo da ferida, onde os queratinócitos estavam presentes ao longo de todo o leito da ferida. Corroborando com os achados Xu et al (2012) apontaram que a cultura ex vivo mantida por duas semanas permitiu estudar a cicatrização de feridas, mostrando em seus ensaios que a reepitelização das feridas também ocorreu cerca de 6 dias. Assim, nossos achados reforçam a possibilidade de estudar no modelo HOSEC o processo de cicatrização tecidual pelo período de 6 dias.

Porém, dentre os fragmentos do nosso estudo, entre as diferentes peles, pode-se observar em relação à taxa de reepitelização que houve grandes variações na migração parcial e total dos queratinócitos de cada fragmento, demonstrando respostas distintas em cada explante. Isso pode ser justificado pela variabilidade dentre os indivíduos doadores e também pelas limitações do próprio modelo, como a falta de circulação (FRADE et al, 2015), isso porque a angiogênese/neovascularização é um processo considerado essencial pós-ferida por auxiliar no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão e dar a continuidade as etapas seguintes no processo de cicatrização (RIDIANDRIS; TAN; BURSILL, 2018). As observações quanto ao fechamento aleatório dentro das triplicatas foram observadas nas 3 peles em estudo.

Ensaio bioquímico para dosar o perfil de estresse oxidativo e de defesas antioxidantes tem sido um recurso utilizado para acompanhar o processo de cicatrização das feridas. Para os autores Masson- Meyers et al (2020), Xian et al (2019) e Leite et al (2015) as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) são fundamentais na maioria dos processos fisiológicos e bioquímicos. No entanto, um desequilíbrio entre a formação das ROS e os mecanismos de defesa dos antioxidantes pode induzir danos. Mudanças significativas e em altas concentrações dos níveis dos radicais livres ou da redução da quantidade dos antioxidantes acarretará em danos celulares e teciduais, promovendo um estado de estresse oxidativo (OS) prejudicial e, portanto, resultando em processos patológicos.

Bilgen et al (2019), Dunnill et al (2015) e Leite et al (2015) preconizam em seus estudos que as ROS são consideradas importantes e necessárias para iniciar e estimular a reparação das feridas, pois sua baixa concentração regula a transmissão do sinal necessário para a sobrevivência celular na luta contra os microorganismos invasores, estas moléculas oxidantes desempenham um papel na defesa do organismo, particularmente, pelos neutrófilos e macrófagos que utilizam suas propriedades reativas e destrutivas para inativar os patógenos fagocitados. Há artigos que evidenciam o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de feridas que não se cicatrizam (KUMAR et al, 2019; BURANASIN et al, 2018; LEITE et al

2015), demonstrando que altas concentrações de ROS em feridas crônicas acarretam em citotoxicidade celular e tecidual resultando em um retardo do processo de reparo tecidual, isto ocorre pela transcrição mediada por ROS que leva à secreção sustentada de citocinas pró-inflamatórias e indução de metaloproteases da matriz. Assim, ROS e RNS excessivos podem direta e indiretamente modificar e/ou degradar proteínas da matriz extracelular e também causar prejuízos a fibroblastos e à função dos queratinócitos, comprometendo assim as fases seguintes do processo cicatricial e causando um retardo na epitalização da ferida.

Diante disto, há moléculas marcadoras de estresse celular, a exemplo, temos o malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos (quantificados pelo ensaio de oxidação ferrosa xilenol laranja – FOX) que são produtos indicadores de peroxidação lipídica. A produção de radicais livres aumenta a peroxidação das moléculas lipídicas e sugerem danos celulares, assim a presença dessas moléculas (MDA e hidroperóxidos) é considerada um marcador indireto de ROS, ambos marcadores utilizados em nosso trabalho. Na avaliação das diferentes peles quando analisadas juntamente, de forma geral os níveis de MDA e FOX se mostraram menores no tempo inicial (D0), com valores semelhantes entre os grupos de tratamento e ao longo do tempo em cultivo. Na dosagem de FOX, apenas os grupos 830 nm e 830 nm + 660 nm expressaram níveis menores quando comparado ao grupo controle no 2º dia, já para os demais dias de análise os grupos com intervenção do laser tiveram uma tendência a níveis maiores.

Por outro lado, na quantificação de MDA houve uma tendência de aumento nos níveis em todos os tempos de análise para todos os grupos que sofreram intervenção quando comparado ao grupo controle.

De forma geral, porém com níveis diferentes em cada pele, a pele em cultura parece ser estimulada a apresentar mais produção de moléculas sinalizadoras de estresse oxidativo, não havendo alteração mediante a estimulação com laser.

Os antioxidantes, por sua vez, são um sistema de proteínas capaz de remover os efeitos deletérios das ROS por meio de doações de seus próprios elétrons, impedindo-os de capturar elétrons de outras moléculas como DNA, proteínas e lipídeos, importantes para o organismo. A GSH, em especial, é um dos principais antioxidantes endógenos do organismo. Sabe-se que suplementações de antioxidantes podem auxiliar na prevenção dos danos oxidativos das células, com a finalidade de melhorar a cicatrização das feridas de difícil resolução (BILGEN et al, 2019; DUNNILL et al 2015). Em contrapartida, o ensaio de DPPH baseia-se na medição da capacidade das moléculas antioxidantes da amostra em capturar o DPPH oferecido. Assim, a atividade antioxidante foi determinada através da dosagem dos níveis de GSH endógeno

encontrados no tecido responsável por atuar na neutralização de peróxidos, além da quantificação através da amostra de sequestrar o radical estável DPPH.

Neste estudo, os níveis de GSH e DPPH nos diferentes grupos ao longo da cultura foram mais baixos em relação ao tempo inicial (D0), mantendo valores semelhantes entre os grupos e ao longo de tempo em cultivo nas diferentes peles. Observa-se ainda que tanto o GSH como o DPPH dos grupos: 830 nm e 830 nm + 660 nm dos dias 2 e 6 apresentaram dosagens menores que o grupo 660 nm.

De forma geral a pele em cultura parece ter uma pequena diminuição na presença de moléculas antioxidantes disponíveis. Porém não foi possível estabelecer um padrão associado ao tempo e/ou aos tratamentos com laser, tanto para essas moléculas antioxidantes como para os outros marcadores.

Assim, esses dados obtidos entre a relação dos níveis de marcadores de estresse e dos antioxidantes encontrados no modelo hOSEC não necessariamente acarretaram um dano ao modelo hOSEC, já que esses marcadores parecem não ter apresentado grandes alterações no estado redox intracelular quando comparado ao grupo controle. Os achados desse estudo, são antagônicos com os dados de Leite et al (2015), onde foi possível observar em seu modelo in vivo que o grupo de ratos hiperlipídico irradiado com laser na dose de 2J apresentou os níveis inferiores de MDA em relação ao seu grupo hiperlipídico não irradiado e expressou níveis mais elevados de GSH em comparação com todos os outros grupos no 7º dia. Provavelmente, essas diferenças estejam relacionadas às diferenças entre os modelos quanto à presença ou ausência de circulação tanto na ativação do estresse quanto às ações antioxidantes.

De forma a avaliar alterações fisiológicas a nível molecular as amostras também foram avaliadas por PCR quantitativa (qPCR) para os alvos, colágeno tipo I (COL1A1), colágeno tipo III (COL3A1), metaloproteinase-1 (MMP-1) e ciclina D1 (CCND1) e os níveis de expressão gênica foram normalizados com o gene de referência  $\beta$ - actina, a escolha destes genes foi feita pela relação que eles apresentam com a cicatrização de ferida.

Masson-Meyers et al (2020) e Chattopadhyay; Raines (2014) abordam a extrema importância da avaliação das fibras de colágeno durante o reparo tecidual, pois o colágeno é considerado o principal componente da matriz extracelular e sua disposição e orientação desempenha papel fundamental na manutenção da integridade biológica e estrutural. Assim, diversos estudos têm utilizado metodologias diferentes para avaliar o colágeno durante o reparo tecidual, dentre as técnicas mais usadas estão a dosagem de hidroxiprolina, imunohistoquímica e métodos de coloração como: Picrosirius red, Tricrômico de Masson e Tricrômico de Gomori.

Neste trabalho o uso da análise molecular através da qPCR foi escolhida para avaliar o modelo hOSEC, por ser um método quantitativo com grande sensibilidade e especificidade.

Para o COL1A1 as amostras de ambas as peles estudadas não apresentaram amplificação detectável. Não se pode afirmar o que acarretou a ausência de expressão gênica do colágeno do tipo I nos fragmentos em estudo, porém a hipótese está relacionada à síntese de colágeno tipo I acontecer em fases mais posteriores do processo de cicatrização, na fase de proliferação que ocorre no período de 3 a 5 dias após a lesão tecidual, há uma elevação na concentração de fibroblastos que participam ativamente com a síntese do colágeno produzindo e depositando grande quantidade de fibras do tipo III (prevalência inicial na cicatrização das feridas), para posteriormente então ocorrer à maturação, com remodelação e substituição das fibras de colágeno do tipo III por fibras do tipo I. Além disso, acredita-se que o colágeno tipo III desempenhe papel no processo de fibrilogênese do colágeno tipo I. Assim, as quantidades das fibras tipo I que são produzidas em menor quantidade que as fibras do tipo III nessa fase inicial podem ter colaborado para não identificação a nível molecular (Prawira et al 2020).

Em contrapartida, foi possível verificar expressão gênica do COL3A1 em todos os fragmentos e diferença estatística, somente no grupo controle entre os fragmentos da pele 2 apresentando diminuição da expressão ao longo do tempo, já nos grupos que foram tratados pelo laser não houve diferença estatística, e de forma geral mantiveram a mesma tendência que o grupo controle.

Ainda ao se comparar os grupos controle e de tratamento dentro do mesmo dia de cultura, houve diferença significativa na expressão gênica de COL3A1 entre os grupos da pele 3 apenas do dia 6, sendo que a expressão gênica seguiu uma tendência de aumento entre os grupos: Controle, 660 nm, 830 nm e 830 nm + 660 nm. Alguns autores como Leite et al (2015), Broughton e Janis (2006) e Li et al (2007) referem que os fibroblastos que se encontram na área lesionada, começam a sintetizar a matriz provisória composta de glicosaminoglicanas e colágeno do tipo III. Portanto, o colágeno é considerado o principal componente estrutural da MEC, permitindo repor a matriz provisória de fibrina- fibronectina.

Para Leite et al (2015), Chattopadhyay; Raines (2014) e Caley; Martins; O'Toole (2015) o processo de migração dos queratinócitos requer sua interação com a matriz extracelular (MEC), pois os queratinócitos utilizam seus receptores de integrina para interagir com a matriz provisória rica em fibrina- fibronectina, ademais, esses receptores são capazes de interagir com as moléculas de colágenos neoformados na lesão provocando a migração dessas células na camada basal para o leito da ferida e regulando a direção dos queratinócitos. Assim, o PDGF secretado pelos queratinócitos pode modular a organização da matriz extracelular, atraindo



fibroblastos, células mononucleares e vasos sanguíneos, por sua vez, a interleucina I produzida por leucócitos pode aumentar a migração de queratinócitos e a síntese de colágeno no processo inicial de cicatrização de feridas. Desse modo, deposições de colágeno na matriz extracelular e a angiogênese irão funcionar em paralelo para o reparo tecidual durante a fase de proliferação, sendo de extrema importância para a restauração tecidual do local da lesão.

Moniri e colaboradores (2018) mencionam que as metaloproteinases (MMPs), estão presentes tanto em feridas agudas como crônicas, e são responsáveis por desempenhar um papel fundamental em todas as fases da cicatrização de feridas, juntamente com os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), contribuindo na regulação da degradação e deposição da MEC que é essencial para a reepitelização da ferida. Ao ocorrer uma lesão, a remodelação do tecido se faz necessária, sendo as MMPs rapidamente ativadas e expressas, encarregadas da função de regular as células epidérmicas, células dérmicas e fibroblastos, além de estimular a angiogênese na proximidade da lesão, com a finalidade de acelerar o fechamento da ferida.

Em nosso estudo pode-se ainda observar as análises para a expressão gênica da MMP-1 em que houve uma diferença estatística nos fragmentos somente da pele 3, tanto para o grupo controle quanto para o grupo 660 nm (ação da luz vermelha) houve uma elevação dos níveis de expressão ao longo do tempo. Já a pele 1, embora tenha apresentado uma diferença estatística no grupo 830 nm + 660 nm ao longo do tempo D4 para D6, a luz associada promoveu uma queda nos níveis de expressão MMP-1. Por sua vez, ao analisar o mesmo dia de cultura e entre todos os grupos, não houve diferença estatística na expressão gênica da MMP-1, e de forma geral mantiveram a mesma tendência que o grupo controle.

Trung; Shahriar; Mayland (2016) e Caley; Martins; O'toole(2015) referem que a MMP-1 faz a hidrólise do colágeno tipo I e juntamente com a integrina  $\alpha 2\beta 1$  promove a migração dos queratinócitos na fase de reepitelização, após a reconstrução da camada basal a expressão epidérmica de MMP-1 é encerrada após ocorrer contato, especialmente, dos queratinócitos com a laminina-111, sinalizando o fechamento da ferida. Desse modo, a expressão de MMP-1 atinge seu pico no dia 1 após o ferimento, seguido por uma diminuição gradual até a reepitelização estar completa. Além disso, a expressão de MMP-1 também foi observada em fibroblastos durante a granulação e angiogênese, onde a MMP-1 pode atuar para remodelar a MEC da ferida. A falta de aumento de expressão MMP-1 pode estar ligada a ausência do colágeno tipo I, já que ela está relacionada com a degradação de colágeno tipo I. Quando comparado o modelo, tempo e as condições submetidas não foi possível detectar expressão de colágeno tipo I e talvez consequentemente, nessas etapas avaliadas também não houve tempo de estímulo para uma grande expressão de MMP-1.

Embora as MMPs desempenhem papéis importantes na reestruturação da MEC e no reparo das feridas, altos níveis de MMPs podem ser responsabilizados pelo aumento da proteólise que leva à degradação excessiva dos constituintes da MEC e interrupções da migração celular, desse modo, permanecendo em um ciclo vicioso que acarreta o retardo da reepitelização (RAMANATHAN et al 2018). Embora presenciado histologicamente a migração/ proliferação dos queratinócitos não foi possível, em nosso estudo, ver grandes modificações decorrentes da irradiação ao longo do tempo, fazendo-se necessário estudar outros parâmetros para chegar a maiores conclusões do comportamento deste modelo hOSEC frente a exposição a laser.

Farahpour e colaboradores (2020) apontam que a ciclina-D1 é considerada um modulador no processo do ciclo celular durante a fase de cicatrização de feridas, sendo associada à divisão e proliferação celular, pois a ciclina-D1 é capaz de mediar a transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S, e conseqüentemente, acelerar o ciclo durante a proliferação celular. Além disso, Blosco et al (2020), abordam que a ciclina-D1 é a responsável por regular a respiração mitocondrial em células epiteliais em ciclo, sendo capaz de encurtar o tempo do ciclo celular.

Para o gene alvo CCND-1 não houve nenhuma correlação significativa entre a amplificação de CCND-1 com o prognóstico do processo de cicatrização. O grupo controle na pele 3 nos tempos D2 e D6 tiveram um leve aumento nos níveis de expressão de CCND-1 quando comparado as demais peles nos mesmos dias. Já em comparação com os grupos de tratamento, para nenhuma das peles e dos grupos ao longo do tempo de cultura houve diferença na expressão gênica, e de forma geral mantiveram a mesma tendência que o grupo controle. Além disso, comparando-se dentro do mesmo dia de cultura e entre todos os grupos, também não houve diferença estatística na expressão gênica da CCND-1.

Deste modo, os dados do presente estudo não expressaram níveis elevados de ciclina-D1 para os grupos irradiados, apresentando resultados semelhantes ao grupo controle. Portanto, a expressão de ciclina, que é uma proteína que desencadeia os eventos do ciclo celular não se apresentou diferente entre os grupos das análises qPCR. O estudo de Farahpour et al (2020) demonstra que os animais (camundongos) tratados com óleo essencial de *Salvia officinalis* (SOO) evidenciaram um alto nível de expressão da ciclina-D1, acelerando e promovendo a proliferação celular.

Nesse trabalho apesar de ser possível observar pela histologia que em vários fragmentos a proliferação da camada de queratinócitos ocorreu, este evento não foi associado a uma grande elevação dos níveis gênicos da ciclina, nem se pode obter uma associação com o laser.

Vários autores fazem referência ao uso da fototerapia e as suas respostas são promissoras em modelos de cicatrização de feridas. Em nosso trabalho, foram encontradas algumas diferenças entre os fragmentos nas análises bioquímicas, moleculares e histológicas analisadas, entretanto, essas mudanças foram sutis quando comparada ao grupo controle, não sendo possível associá-las ao mecanismo fotobiológico promovido pelo laser neste modelo hOSEC. Porém, uma suposição a esses dados está relacionada ao tempo de análises que ocorreram após 24h da irradiação, supondo que os explantes poderiam ter voltado ao seu metabolismo celular próximo do basal, e conseqüentemente os eventos bioquímicos e moleculares não seriam tão notórios, além disso, há várias vias de sinalização que podem ser ativadas e modificadas quando expostas a ação do laser em diferentes comprimentos de onda atuando e modificando a resposta tecidual.

Ademais, outro fator que poderia ter comprometido a ação do laser seria à aplicação em um tecido em condições normais. Já há autores que abordam em seus estudos que à aplicação de fototerapia em feridas crônicas associada às condições patológicas ou de estresse celular promovem respostas mais eficazes quando comparado aos tecidos em condições normais. Isso seria justificado pelas células com potencial redox reduzido, com elevação de ROS, as quais tornariam mais sensíveis às irradiações de luz e, portanto, apresentariam melhores respostas comparadas as células com potencial redox normal (LEITE et al, 2015; PRINDEZE et al, 2012; KAVIANI et al, 2011).

Desse modo, o estresse gerado pelas modificações metabólicas poderia desencadear uma forma mais oxidada do fotorreceptor citocromo C oxidase, ocasionando uma maior fotossensibilidade mitocondrial à fototerapia o que acarretaria um aumento na produção de ROS e ATP, aumentando o metabolismo e por conseqüência estimularia mecanismos antioxidantes que promoveria o equilíbrio redox, aumentando a função celular. Logo, melhorando o processo cicatricial (LEITE et al, 2015; TAFUR; MILLS, 2008).

Após as análises experimentais concluídas, observamos algumas limitações presentes para os achados deste estudo. Sendo que essas limitações incluíram a heterogeneidade das peles, ocasionando grandes variações nas análises. Em decorrência do número das amostras serem pequeno e pelo fato dessas peles responderem de forma diferente, acredita-se que aumentando o número amostral poderíamos observar melhor os comportamentos bioquímicos e moleculares do modelo hOSEC e suas tendências. Outra situação a ser ponderada é a questão das úlceras serem de 3 mm de diâmetro e restrita praticamente à epiderme e derme superficial, um microrregião frente ao todo do fragmento de 10mm de diâmetro envolvendo epiderme, dermes superficial e profunda, fato que provavelmente pode ter proporcionado uma diluição

dos marcadores da área ulcerada em si e conseqüentemente os resultados não se diferenciaram dentre os grupos. Além disso, considerando que as maiores transformações ocorridas no período foram limitadas à epiderme, outra limitação foi não termos focado em marcadores de diferenciação de renovação epitelial da camada basal. Apesar dos resultados obtidos não evidenciarem diferenças significantes entre os tipos de tratamentos e suas modificações nos tempos estabelecidos, este estudo confirmou o potencial do modelo hOSEC para o estudo da cicatrização cutânea essencialmente epidérmica, independente das células inflamatórias, além de abrir novas perspectivas para o estudo da cicatrização de feridas cutâneas e a ação da fototerapia no modelo ex vivo.

# 6 CONCLUSÃO

“Não há atalhos para nenhum destino onde se vale a pena chegar.”  
Beverly Sills

O modelo ex vivo de pele humana (hOSEC) se confirmou como um modelo experimental viável para avaliar o processo de cicatrização, mesmo permanecendo em cultura apenas pelo período de 6 dias.

Em relação à interação da luz com o tecido nos diferentes comprimentos de onda (660 nm e 830 nm) utilizados neste modelo hOSEC, foi possível observar viabilidade do modelo em relação à aplicação da fototerapia, mantendo-se as células viáveis, porém outros parâmetros serão necessários para identificar e compreender melhor os possíveis mecanismos de ação envolvidos no processo estimulado pelos diferentes comprimentos de onda vermelho e infravermelho aplicados neste modelo e, assim poder relacionar a fotobiomodulação com os processos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos a nível celular/molecular.

Os dados deste estudo vieram para contribuir na compreensão do comportamento deste modelo hOSEC frente ao uso da fototerapia no processo de cicatrização tecidual, deixando perspectivas à necessidade de estudos futuros.

# 7 REFERÊNCIAS

“Pesquisar é acordar para o mundo”  
Marcelo Lamy

ABRAHAMS, P.H.; CRAVEN, J.L.; LUMLEY, J.S.P. The structure of the body – the systems and organs. **In: Illustrated clinical anatomy.** New York: Oxford University Press, p. 2-20, 2005.

ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Ther.** Dec; 52(3), p. 407-422, 1991.

BAGNATO, V.S.; PAOLILLO, F.R. **Novos Enfoques da Fototerapia para Condicionamento Físico e Reabilitação.** São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, p.198, 2014.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E.A. WoundCare Essentials. **In: Advances in skin & Wound Care.** 1<sup>st</sup>ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, p. 364-373, 2004.

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

BILGEN, F.; URAL, A.; KURUTAS, E.B.; BEKERECIOGLU, M. The effect of oxidative stress and Raftlin levels on wound healing. **Int. Wound J.** Oct; 16(5):1178-1184, 2019.

BLASCO, N.; BEÀ, A.; BARÉS, G. et al. Involvement of the mitochondrial nuclease EndoG in the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species. **Redox Biol.** 37:101736, 2020.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, 181: 1199-2000, 1958.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: An overview. **Plast. Reconstr. Surg**, Jun; v.117, p.1e-S-32e-S, 2006.

BURANASIN, P.; MIZUTANI, K.; IWASAKI, K. et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. **PLOS One.** 13(8):e0201855, 2018.

CAI, H.; GU, Y.; SUN, Q.; ZENG, J.; DONG, N.; ZHAO, G. Effect of hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photo-dynamic therapy on hypertrophic scar fibroblasts. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 27: 90-96, 2011.

CALEY, M.P.; MARTINS, V.L.; O'Toole, E.A. Metalloproteinases and Wound Healing. **Adv Wound Care** (New Rochelle). 4(4):225-234, 2015.

CALZAVARA-PINTON, P.G.;ROSSI, M.T.; ARONSON, E.; SALA, R.A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 1: inflammatory and aesthetic indications, **PhotochemPhotobiol Sci.** 12: 148-157, 2013.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq.Bras. Cir. Dig.** v.20 (1): 51-58, 2007.

CARDOSO, C.R.; FAVORETO, S.J.R.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIM, J.O.; BARBAN, G.B.; FERRAZ, D.B.; SILVA, J.S. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair.**Immunobiology.** v. 216, p. 409-15, 2011.

CASTRO, N.; GILLESPIE, S.R.; BERNSTEIN, A.M. Ex Vivo Corneal Organ Culture Model for Wound Healing Studies. **J.Vis. Exp.**, n. 144, 2019.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers.** 101(8):821-833, 2014.

CHILDRESS, B.B.; STECHMILLER, J.K. Role of nitric role in wound healing.**BiologicalResearch for Nursing,** v. 4(1): 5-15, 2002.

CLARK, R.A.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds.**J. Invest.Dermatol.**, v. 127, n. 5, p. 1018-29, May 2007

COALSON , E. et al. Stem cell therapy for chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside, **Genes Dis**, 17;6(4):342-358, Sep 2019.

COSTA, C.M.; SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **J BrasPatolMed Lab.** 2006;42(5):345-50

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

DE FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron.**22(3): 1–7, 2016.

DE JESUS GUIRRO, R.R. et al. Measurement of Physical Parameters and Development of a Light Emitting Diodes Device for Therapeutic Use. **Journal of Medical Systems.**Mar 12;44(4):88, 2020.

DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats.**Journal of Rehabilitation Research and Development.**Mar/Abr, v.41, n.2, p. 147–54, 2004.

DERDERIAN, C.A.; BASTIDAS, N.; LERMAN, O.Z.; BHATT, K.A.; LIN, S.E.; VOSS, J.; HOLMES, J.W.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Mechanical strain alters gene expression in an in vitro model of hypertrophic scarring. **Ann. Plast. Surg.** Jul;55(1):69-75; 2005.

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

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**. Jul, 23(3), 223-229, 2015.

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; LEAPER, D.; GEORGOPOULOS, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **Int. Wound J.** Feb;14(1):89-96, 2015.

EDSBERG, L.E.; BLACK, J.M.; GOLDBERG, M.; MCNICHOL, L.; MOORE, L.; SIEGGREEN, M. Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System: Revised Pressure Injury Staging System. **J. Wound Ostomy Continence Nurs.** Nov/Dec, 43(6):585- 597, 2016.

EDWARDS, S.L. Innate Defences. In: MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. **Physiology for nursing practice**. 3rd ed. Spain: Elsevier, p.635-683, 2005.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**. Mar, 127(3):514-25, 2007.

FARAHPOUR, M.R.; PIRKHEZR, E.; ASHRAFIAN, A.; SONBOLI, A. Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. **Biomed Pharmacother**. Aug, 128:110-120, 2020.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir Bras**, v. 2, p. 28-34, 2005.

FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**. May-Jun; 22(3): 7000417, 2016.

GAURAV, K.KESHRI.; ASHEESH GUPTA.; ANJU, YADAV.; SANJEEV, K.SHARMA.; SHASHI BALA SINGH. Photobiomodulation with Pulsed and Continuous Wave Near-Infrared Laser (810 nm, Al-Ga-As) Augments Dermal Wound Healing in Immunosuppressed Rats. **PLOS One**. Nov, 11(11): e0166705, 2016.

GERARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; REGNARD, K.; MOZE-HENRY, N.; YADAN, J.C.; CHAUDIERE, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**. Oct, 11(10): 1176-83, 1998.

GRADA A, MERVIS J, FALANGA V. Técnicas de Pesquisa Simplificadas: Modelos Animais de Cicatrização. **J. Invest. Dermatol**. 2018; 138 : 2095-2105.e1.



GUPTA, A.; VECCHIO, D.; SADASIVAM, M.; HAMBLIN, M.R.; PAM, N.; AVCI, P.; PAM, Z. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **SeminCutan Med Surg**. 32(1):41-52, 2013.

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

HABIF, T.P. Principles of diagnosis and anatomy. **Clinical Dermatology: a color guide to diagnosis and therapy**. 3<sup>rd</sup>ed. Missouri: Von Hoffman Press. p.1-24, 1996.

HAMBLIN, M.R. Photobiomodulation or low-level laser therapy. **J Biophotonics**, 9(11-12): 1122–1124, 2016.

HEYER, K.; HERBERGER, K.; PROTZ, K.; GLAESKE, G.; AUGUSTIN, M. Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data. **Wound Repair and Regeneration**. 29 Feb, 24(2):434-442, 2016.

HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-Response** 7(4):358–383, 2009.

HUBRECHT, R.C.; CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals**, 9 (10), 754, 2019.

JAMES, W.D.; BERGER, T.G.; ELSTON, D.M. **Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology**. Philadelphia: Elsevier Saunders, (10th ed.), 2006.

JÄRBRINK, K.; NI, G.; SÖNNERGREN, H.; SCHMIDTCHEN, A.; PANG, C.; BAJPAI, R.; CAR, J. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**. 5(1): 152, 2016.

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

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed., p.359, 2004..

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**. Apr;28(2):159-60, 2010.

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. 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. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol**. 84 : 1091-1099, 2008.

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.

KARU, T.; 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.

KARUKONDA, S.R.K.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; McBURNEY, E.I.; RUSSO, G.; MILIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing: part 1. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v.39, p. 250-257, 2000.

KAVIANI, A.; DJAVID, G.E.; ATAIE-FASHTAMI, L.; FATEH, M.; GHODSI, M.; SALAMI, M.; ZAND, N.; KASHEF, N.; LARIJANI, B. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report. **Photomed Laser Surg**. Feb;29(2):109-14, 2011.

KOLARSICK, P.A.J.; KOLARSICK, M.A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin, **Journal of the Dermatology Nurses**, 3(4):194, July-August 2011.

KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7th. ed. Rio de Janeiro: Saunders, p. 49-124, 2005.

KUMAR, D.; JENA, G.R.; RAM, M.; LINGARAJU, M.C.; SINGH, V.; PRASAD, R.; KUMAWAT, S.; KANT, V.; GUPTA, P.; TANDAN, S.K.; KUMAR, D. Hemin attenuated oxidative stress and inflammation to improve wound healing in diabetic rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 392(11):1435-1445, Nov 2019.

LEBONVALLET, N. et al. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **Eur J Dermatol**. v. 20, p. 671-84, 2010

LEITE, S.N.; ANDRADE, T.A.; MASSON-MEYERS, D.S.; LEITE, M.N.; ENWEMEKA, C.S.; FRADE, M.A. Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats. **An Bras Dermatol**. Nov-Dec; 89(6):899-904, 2014.

LEITE, S.N.; LEITE, M.N.; CAETANO, G.F.; OVIDIO, P.P.; JORDÃO JÚNIOR, A.A.; FRADE, M.A. Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. **Lasers Med Sci**. Jul;30(5):1481-8, 2015

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol** 25(1):9-18, 2007.

LIU, J.; SHEN, J.X.; WU, H.T.; LI, X.L.; WEN, X.F.; DU, C.W.; ZHANG, G.J. Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. **Discov Med**. May;25(139):211-223, 2018.

LIAO, T. et al. Nestin+ progenitor cells isolated from adult human sweat gland stroma promote reepithelialisation and may stimulate angiogenesis in wounded human skin ex vivo. **Arch Dermatol Res**. May;311(4):325-330, 2019.

LIEDKE, D.C.F.; JOHANN, D.A.; DANSKI, M.T.R. Consultório de enfermagem para tratamento de feridas em hospital de ensino. **CogitareEnferm.** 19(3):590-6, 2014.

MARGOLIS, D.J. Epidemiology of Wounds. In: Mani R., Romanelli M., Shukla V, (eds). **Measurements in WoundHealing.** Springer, London, 2012.

MASSON, D.S.; SALVADOR, S.L.; POLIZELLO, A.C.M.; FRADE, M.A.C. Atividade anantimicrobiana do oleo-resina de copaiba (*Copaiferalangsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev.Bras.Pi.Med.**, Campinas, v15, n.4, p.664-669, 2013.

MASSON-MEYERS, D.S.; ANDRADE, T.A.M.; CAETANO, G.F.; GUIMARAES, F. R.; LEITE, M.N.; LEITE, S.N.; FRADE, M.A.C. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **Int. J. Exp. Pathol.** 101, 21-37, 2020.

MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. **Antioxid Redox Signal.** Mar-Apr;7(3-4):472-8, 2005.

MENDOZA- GARCIA, J.; SEBASTIAN, A.; ALLAN, E. et al. Differential cytotoxic response in keloid fibroblasts exposed to photodynamic therapy is dependent on photosensitizer precursor, fluence and location of fibroblasts within the lesion. **Arch Dermatol Res;** 304: 549- 562, 2012.

MENDOZA-GARCIA, J.;SEBASTIAN, A.; ALONSO-RASGADO, T.; BAYAT,A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy. **Wound Rep Reg,** v.23, p. 685–702. 2015.

MENDOZA-GARCIA, J.;SEBASTIAN, A.; ALONSO-RASGADO, T.; BAYAT,A. Ex vivo evaluation of the effect of photodynamic therapy on skin scars and striaedistensae.**PhotodermatolPhotoimmunolPhotomed;** 31: 239–251, 2015b.

MENKE, N.B.;WARD, K.R.;WITTEN, T.M.;BONCHEV, D.G.;DIEGELMANN, R.F. Impaired wound healing.**Clin.Dermatol.** Jan-Feb;25(1):19-25, 2007.

MESTER, A.; MESTER A. The History of Photobiomodulation: EndreMester (1903–1984). **Photomedicine and Laser Surgery.**Aug, v.35(8), p. 393–394, 2017.

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

MONIRI, M.; BOROUMAND MOGHADDAM, A.; AZIZI, S. et al. Molecular study of wound healing after using biosynthesized BNC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites assisted with a bioinformatics approach. **Int. J. Nanomedicine.**13:2955-2971, 2018.

MOSCA, R.C.; ONG, A.A.; ALBASHA, O.; BASS, K.; ARANY, P. Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, **Photoceutical Approach.** **Adv Skin Wound Care.** Apr;32(4):157-167, 2019.

NYSTRÖM, K.; BILLER, M.; GRAHN, A.; LINDH, M.; LARSON, G.; OLOFSSON, S. Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells. **J. Virol Methods.** Jun 15;118(2):83-94, 2004.

OERJ Informar e Formar opinião. **Cinco milhões de pessoas convivem com feridas crônicas no Brasil**. Agosto/2015 Disponível em: <https://oestadorj.com.br/cinco-milhoes-de-pessoas-convivem-com-feridas-cronicas-no-brasil/>. Acesso em: 29,abril, 2020.

OLIVEIRA SAMPAIO, S.C.; MONTEIRO, J.S.; CANGUSSÚ, M.C.; PIRES SANTOS, G.M.; SANTOS, M.A.; SANTOS, J.N.; PINHEIRO, A.L. Effect of laser and LED phototherapy on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **LasersMedSci**, v. 28(3):799-806, 2013.

PASSARELLA, S.; KARU T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **J.PhotochemPhotobiol B: Biol.** 2014;140: 344–358.

PATEL, N.P.; LABROPOULOS, N.; PAPPAS, P.J. Current management of venous ulceration. **PlastReconstrSurg**, v. 117.(7 Suppl):254S-260S, 2006.

PAULA, Natalia Aparecida de. **Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae***. 2019. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

PINHEIRO, A.L.B.; ALMEIDA, P.F.; SOARES, L.G.P.; "**Princípios fundamentais dos lasers e suas aplicações**", p. 815 -894. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

PRAWIRA, A.Y.; HOSAKA, Y.Z.; NOVELINA, S.; FARIDA, W.R.; DARUSMAN, H.S.; AGUNGPRIYONO, S. Morphological evaluation of polysaccharide content and collagen composition during cutaneous wound healing in the Sunda porcupine (*Hystrix javanica*). **J. Vet. Med. Sci.** 2020;82(5):506-515.

PRINDEZE, N.J.; MOFFATT, L.T.; SHUPP, J.W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 237, n. 11, p. 1241-8, Nov, 2012.

RAKITA, A.; NIKOLIĆ, N.; MILDNER, M.; MATIASEK, J.; ELBE-BÜRGER, A. Re-epithelialization and immune cell behaviour in an ex vivo human skin model. **Sci. Rep.** Jan 8;10(1):1, 2020.

RAMANATHAN, G.; THYAGARAJAN, S.; SIVAGNANAM, U.T. Accelerated wound healing and its promoting effects of biomimetic collagen matrices with siderophore loaded gelatin microspheres in tissue engineering. **Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.** Dec 1, 93:455-464, 2018 .

RANGANATHA, N.; KUPPAST, A. review on alternatives to animal testing methods in drug development. **Academic Sciences**. v. 5, n. 5, p. 28-32. 2012.

RAWAT, S.; SINGH, R.; THAKUR, P.; KAUR, S.; SEMWAL, A. Wound healing agentes from Medicinal Plants: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**.S1910-S1917, 2012.

RIDIANDRIES, A.; TAN, J.T.M.; BURSILL, C.A. The Role of Chemokines in Wound Healing. **Int J Mol Sci** ; 19 (10): 3217, 2018

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, oct 24;25(1):192-205, 1968.

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. **Sistema Tegumentar**. In **Anatomia e Fisiologia** (8th ed.). Lusociência, 2011.

SINNO H, PRAKASH S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plast Surg Int*. 146-764, 2013.

SORG, H.; TILKORN, D.J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHISKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, 58:81-94, 2017.

SCHMITT, L.; AMANN, P.M.; MARQUARDT, Y. et al. Molecular effects of fractional ablative erbium:YAG laser treatment with multiple stacked pulses on standardized human three-dimensional organotypic skin models. **Lasers Med Sci**. 32, 805–814, 2017.

STEINSTRÄESSER, L.; RITTIG, A.; GEVERS K. et al. A human full-skin culture system for interventional studies. **Eplasty**. 9:e5, 2009.

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.

TAFUR, J.; MILLS, P.J. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. **Photomed Laser Surg**. Aug;26(4):323-8, 2008.

TRUNG, T.; NGUYEN, SHAHRIAR MOBASHERY E MAYLAND CHANG. Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing, Wound Healing - New insights into Ancient Challenges, Vlad Adrian Alexandrescu, **IntechOpen**, 12out 2016.

UD-DIN, S.; THOMAS, G.; MORRIS, J.; BAYAT, A. Photodynamic therapy: an innovative approach to the treatment of keloid disease evaluated using subjective and objective non-invasive tools. **Archives of dermatological research**. Apr, 305(3):205-14, 2013.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **J.Int. Med. Res.**, v, 37(5):1528- 1542, 2009.

WALL, S.J. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases during impaired wound healing of the diabetes mouse. **J. Invest. Dermatol.**, v. 119, n. 1, p. 91-8, Jul 2002.

WANG, C.; XIE, J.; JIANG, J.; HUANG, W.; CHEN, R.; XU, C.; ZHANG, Y.; FU, C.; YANG, L.; CHEN, P.C.; SUNG, K.L. Differential expressions of the lysyl oxidase family and matrix metalloproteinases-1, 2, 3 in posterior cruciate ligament fibroblasts after being co-cultured with synovial cells. **Int Orthop**. Jan;39(1):183-91, 2015.

WILHELM, K.P.; WILHELM, D.; BIELFELDT, S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies, **Skin Res. Technol.**Feb;23(1):3-12, 2017

XIAN, D.; SONG, J.; YANG, L.; XIONG, X.; LAI, R.; ZHONG, J. Emerging Roles of Redox-Mediated Angiogenesis and Oxidative Stress in Dermatoses. **Oxid.Med. Cell Longev.**Apr,16, 2019: 2304018, 2019.

XU, W.; JONG, HONG, S.; JIA, S. et al. Application of a partial-thickness human *ex vivo* skin culture model in cutaneous wound healing study. **Lab. Invest.** 92, 584–599, 2012.

ZHANG, G.Y.; LANGAN, E.A.; MEIER, N.T.; FUNK, W.; SIEMERS, F.; PAUS, R. Thyroxine (T4) may promote re-epithelialisation and angiogenesis in wounded human skin *ex vivo*. **PLOS One.** Mar, 29;14(3), 2019.

ZHAO, A.; YANG, L.; MA, K.; SUN, M.; LI, L.; HUANG, J.; LI, Y.; ZHANG, C.; LI, H.; FU, X. Overexpression of cyclin D1 induces the reprogramming of differentiated epidermal cells into stem cell-like cells. **CellCycle.**15(5):644-53,2016.

# ANEXOS

## ANEXO 1 - Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisa em seres humanos do HCRP e FMRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 06 de dezembro de 2018.

Ofício nº 3473/2018  
CEP/MGV

**PROCESSO HCRP nº 10757/2018**

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado "INFLUÊNCIA DA FOTOTERAPIA PARA A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA NO MODELO HOSEC" – Projeto de Pesquisa Versão 3 – 09/11/2018, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 482ª Reunião Ordinária realizada em 03/12/2018, e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico Versão 2 data 09/10/2018.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Resolução nº 466/2012

CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

**DRA. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores  
GISLAINE MARQUES FARIA  
COORDENADOR: PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE  
PESQUISADORES ENVOLVIDOS: MSc. NATÁLIA APARECIDA DE PAULA/ MSc. MARCEL NANI  
LEITE  
Depto. de Clínica Médica

## ANEXO 2-Consentimento e concordância do Setor de Cirurgia Plástica

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2018.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior  
Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas Hospital das Clínicas-  
HCFMRP - USP

Prezado Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior

Viemos solicitar sua autorização e disponibilidade para auxiliar no projeto de pesquisa da pós-graduanda Gislaine Marques Faria, intitulado "Influência da Fototerapia para Cicatrização Cutânea no Modelo hOSEC".

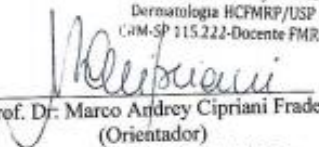
A realização deste projeto envolve o uso da pele proveniente de abdominoplastias eletivas para poder estudar a cicatrização de úlceras no modelo de pele em cultivo laboratorial. Após estudos e tentativas no laboratório, a técnica foi padronizada com a utilização de pele de abdômen, e, portanto, gostaria de solicitar que concorde com a doação de pele excedente de doze abdominoplastias realizadas pela plástica sob sua supervisão. O projeto está sendo submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (número parecer: 2.974.802), onde o mesmo requer concordância por parte do Setor da Plástica para conseguir a obtenção da pele e desenvolver a pesquisa. Os pacientes selecionados irão assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) concordando com a doação do fragmento de pele.

Esperamos contar com o seu apoio, colocando-me à sua disposição para maiores esclarecimentos.

Muito obrigado, agradeço sua atenção.

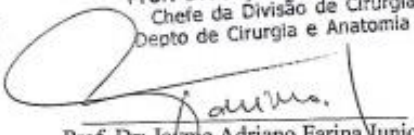
Cordialmente,

Prof. Dr. Marco Andrey C. Frade  
Dermatologia HCFMRP/USP  
CRM-SP 115.222-Docente FMRP



Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade  
(Orientador)  
Departamento de Clínica Médica  
Universidade de São Paulo  
FMRP-USP

Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Júnior  
Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica  
Depto de Cirurgia e Anatomia FMRP-USP



Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior  
Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica  
HC-FMRP-USP