

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETÍCIA SANDIS BARBOSA

**EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A REPARAÇÃO
TECIDUAL EM ANIMAIS APÓS QUEIMADURA DE TERCEIRO GRAU**

ALFENAS/MG
2019

LETÍCIA SANDIS BARBOSA

**EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A REPARAÇÃO
TECIDUAL EM ANIMAIS APÓS QUEIMADURA DE TERCEIRO GRAU**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Reabilitação da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Avaliação e Intervenção em Ciências
da Reabilitação.
Orientadora: Profa. Dra. Lígia de Sousa Marino
Co-Orientador: Prof. Dr. Romulo Dias Novaes

ALFENAS/MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

B238e Barbosa, Leticia Sandis.
Efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre a reparação tecidual em animais após queimadura de terceiro grau -- Alfenas/MG, 2019.
64 f. : il. –

Orientadora: Lígia de Sousa Mariano.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Queimadura de terceiro grau. 2. Fotobiomodulação. 3. Reabilitação. I. Mariano, Lígia de Sousa. II. Título.

CDD-615.82

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências da Reabilitação
Av. Jovino Fernandes Sales, 2600 – Santa Clara 0/ Alfenas - MG CEP 37133-840
Fone: (35) 3701-1925 (Secretaria)
<https://www.unifal-mg.edu.br/ppgcr/>



LETÍCIA SANDIS BARBOSA

EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A REPARAÇÃO TECIDUAL EM ANIMAIS APÓS QUEIMADURA DE TERCEIRO GRAU

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação pela Universidade Federal de Alfenas Área de Concentração: Avaliação e Intervenção em Ciências da Reabilitação.

Aprovado em: 08 de novembro de 2019.

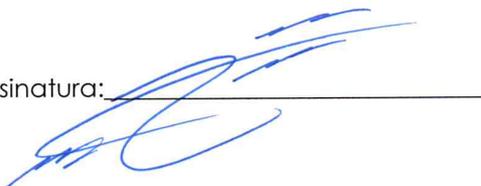
Profa. Dra. Lúgia de Sousa Marino
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Lucas Emmanuel Pedro de Paiva
Teixeira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Ao departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

A Prof^a Ligia de Sousa, orientadora, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Prof. Romulo Dias Novaes, co-orientador, pelo suporte técnico, e ensinamentos compartilhado em laboratório.

Aos meus colegas colaboradores Alice, Lucas e Marcella, pelo esforço e dedicação empregado nessa pesquisa, tornando real este trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - Código de Financiamento 001 e da Universidade federal de Alfenas - UNIFAL-MG

À FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro concedido.

A todos profissionais que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

RESUMO

Queimaduras são lesões térmicas do tecido orgânico que resulta em perda da integridade cutânea e conseqüente mudanças nas condições mecano-fisiológicas dos tecidos. Quando de terceiro grau, as queimaduras são mais profundas e têm conseqüências mais graves, com maior dificuldade do processo de regeneração. A Terapia por fotobiomodulação (FBM) induz uma melhor produção das fibras colágenas e possibilita menor tempo de contração da ferida ao tecido neo-formado. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da FBM com comprimento de onda de 658nm, 830nm e 904nm no reparo tecidual em um modelo experimental de queimadura de terceiro grau, em ratos. Foram utilizados ratos Wistar (machos) provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados. Foi realizada queimadura de terceiro grau de 3 cm de diâmetro, em região dorsal do animal. 128 animais foram divididos em quatro grupos: G658 (recebeu FBM de 658nm), G830 (recebeu FBM de 830nm), G904 (recebeu FBM de 904nm) e GC (Controle). Cada grupo foi avaliado nos 3º, 7º, 14º e 21º dias após a queimadura, recebendo respectivamente uma, três, seis e nove aplicações de FBM. Para a aplicação em todos os grupos foi utilizado fluência de 4J/ cm², em 8 pontos na borda da lesão e um no centro. Foi realizada análise da temperatura cutânea superficial pela câmera de termografia infravermelha. A contagem de vasos sanguíneos e células inflamatórias foram realizadas pelas análises histológicas após as amostras serem coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para contagem do colágeno foi realizada coloração pelo *picrosirius red*. Após contagem de células inflamatórias observou-se uma diferença significativa intragrupos no G658 (p=0,006) e no G904 (p<0,0001). Quantificação de colágeno tipo III, diferenças foram encontradas no G658 (p<0,0001), G830 (p=0,02) e GC (p<0,0001), na análise intergrupos, os dias de análise 3PO (p=0,004) e 7PO (p<0,0001) apresentaram diferenças significantes entre os grupos. No 7PO, o G658 apresentou aumento de vasos sanguíneos em relação ao GC. Em 21PO, o G658 mostrou maior número de vasos sanguíneos em comparação ao G904 (p=0,02) e GC (p=0,005). No 21PO o GC apresentou maior temperatura cutânea em relação ao G904 (p=0,02). Pode-se concluir que a FBM de 658nm é mais efetiva na reparação tecidual após queimadura de 3º grau.

Palavras-chave: Queimadura de terceiro grau. Fotobiomodulação. Reabilitação.

ABSTRACT

Burns are thermal lesions of the organic tissue that result in loss of skin integrity and consequent changes in the mechanophysiological conditions of the tissues. When third degree, the burns are deeper and have more serious consequences, with greater difficulty in the regeneration process. Photobiomodulation Therapy (FBM) induces better production of collagen fibers and enables shorter wound contraction time to neo-formed tissue. The aim of this study was to evaluate the influence of 658nm, 830nm and 904nm wavelength FBM on tissue repair in an experimental third degree burn model in rats. Wistar rats (males) from the UNIFAL Central Campus Bioterium were used. All experiments followed the established ethical standards for experimentation with agreed animals. A third degree burn of 3 cm in diameter was performed in the dorsal region of the animal. 128 animals were divided into four groups: G658 (received 658nm FBM), G830 (received 830nm FBM), G904 (received 904nm FBM) and GC (Control). Each group was evaluated on the 3rd, 7th, 14th and 21st days after the burn, receiving respectively one, three, six and nine FBM applications. For application in all groups, a fluency of 4J/cm² was used, at 8 points at the edge of the lesion and one at the center. Surface skin temperature analysis was performed by infrared thermography camera. Blood vessel and inflammatory cell counts were performed by histological analysis after the samples were stained with hematoxylin and eosin (HE). For collagen counting, picrosirius red staining was performed. After inflammatory cell count, a significant intragroup difference was observed in G658 ($p = 0.006$) and G904 ($p < 0.0001$). Quantification of type III collagen differences were found in G568 ($p < 0.0001$), G830 ($p = 0.02$) and CG ($p < 0.0001$), in the intergroup analysis, the 3PO days of analysis ($p = 0.004$) and 7PO ($p < 0.0001$) showed significant differences between the groups. At 7PO, G658 showed an increase in blood vessels compared to CG. At 21PO, G658 showed a higher number of blood vessels compared to G904 ($p = 0.02$) and CG ($p = 0.005$). At 21PO the CG presented higher skin temperature compared to G904 ($p = 0.02$). It can be concluded that 658nm FBM is more effective in tissue repair after 3rd degree burn.

Keywords: Burn of the third degree. Photobiomodulation. Rehabilitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Atuação da FBM na mitocôndria e liberação de ATP, ROS e oxido nítrico.....	21
Figura 2 - Profundidade de penetração da luz emitida pela FBM nos diferentes comprimentos de onda.....	23
Figura 3 - Placa de ferro acoplada a resistência para gerar aquecimento.....	26
Figura 4 - Área de lesão após procedimento de queimadura.....	27
Figura 5 - Pontos de aplicação da FBM.....	29
Figura 6 - Modelo de delineamento do estudo.....	30
Figura 7 - Demonstração contagem das células inflamatórias por área pré-determinada para cada foto das lâminas nos grupos estudados.....	32
Figura 8 - Demonstração da grade de 100 pontos para quantificação de colágeno.....	33
Figura 9 - Demonstração da grade de 100 pontos para quantificação de vasos.....	34
Figura 10 - A- Metodologia de captura de imagens da câmera termográfica infravermelha/ B- Imagem visualizada no software de análise.....	36
Figura 11 - Resultados da microscopia dos tecidos lesionados corados com H&E.....	39
Figura 12 - Resultados da microscopia dos tecidos lesionados corados com Picrosirius red	41
Figura 13 - Resultados da microscopia dos tecidos lesionados corados com H&E.....	43
Figura 14 - Fotos termográficas dos diferentes tempos de coleta de dados nos grupos estudados.....	46
Quadro 1 - Parâmetros de aplicação da FBM, nos grupos estudados.....	28
Quadro 2 - Grupos estudados, tempos de pesquisa, momento da eutanásia e número de aplicação da FBM	30
Gráfico 1 - Resultados do número de células inflamatórias nos terceiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.....	38

Gráfico 2 - Resultados relacionados ao colágeno tipo III nos terceiros, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.....	40
Gráfico 3 - Resultados do número de intersecções encontradas na análise dos vasos sanguíneos nos terceiros, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.....	42
Gráfico 4 - Resultados do número de intersecções encontradas na análise dos vasos sanguíneos nos terceiros, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperatura cutânea superficial antes do procedimento de queimadura comparada com os diferentes dias de análise, nos grupos estudados.....	44
Tabela 2 - Correlação entre as variáveis de estudos no 3º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados.....	47
Tabela 3 - Correlação entre as variáveis de estudos no 7º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados.....	47
Tabela 4 - Correlação entre as variáveis de estudos no 14º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados.....	48
Tabela 5 - Correlação entre as variáveis de estudos no 21º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados.....	48

SÚMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1.	Queimadura de 3º grau.....	18
3.2.	Processo de reparação tecidual.....	20
3.3.	Terapia de fotobiomodulação.....	25
4.	MATERIAIS E MÉTODO.....	25
4.1.	Modelo animal.....	25
4.2.	Modelo experimental – Queimadura de 3º grau.....	26
4.3.	Protocolo de tratamento com FBM e grupos de estudo.....	27
4.4.	Avaliação dos resultados.....	31
4.4.1	<i>Analises histológicas para avaliação das células inflamatórias, colágeno</i> <i>Colágeno tipo III e vasos sanguíneos.....</i>	31
4.4.1.1	Contagem de células inflamatórias.....	31
4.4.1.2	Análise de birrefringência do colágeno tipo III.....	32
4.4.1.3	Morfometria dos vasos sanguíneos.....	34
4.4.2	<i>Temperatura Cutânea Superficial.....</i>	35
4.5.	Análise Estatística.....	36
5.	RESULTADOS	37
5.1.	Células Inflamatórias.....	37
5.2.	Colágeno.....	39
5.3.	Vasos Sanguíneos.....	41
5.4.	Temperatura cutânea superficial.....	43
5.5.	Correlações	46
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	ANEXO I.....	64

1 INTRODUÇÃO

Queimaduras são lesões que acometem o tecido cutâneo e subjacentes, secundária a um trauma de origem térmica. Tais lesões podem acometer superficialmente o tecido cutâneo assim como causar severos traumas sistêmicos e comprometer a homeostasia do organismo (BRASSOLATTI et al., 2018; SOUSSI et al., 2018).

As queimaduras constituem um problema de saúde pública mundial, afeta, principalmente, países de baixa e média renda (PALMIERI, 2016). A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 265 mil mortes são causadas, anualmente, por queimaduras (KEVIN et al., 2017). Os custos com hospitalização do paciente queimado são, em média, de 856 dólares e a taxa geral de mortalidade de 14,21% (TIAN et al., 2018; SANTOS et al., 2017). As maiores causas de lesões por queimaduras envolvem escaldamento, seguida por fogo. Homens (71,3%) são mais acometidos que mulheres (28,7%) e as extremidades são as áreas frequentemente queimadas. Altas taxas de queimaduras são observadas em crianças, sendo que, crianças menores de 5 anos representam 24% de todas as internações por queimadura (SANTOS et al., 2017). A mortalidade global de queimaduras em crianças é de 2,5 para 100 mil (PALMIERI, 2016).

Na América do Norte, mais de 30 mil pacientes queimados são admitidos a cada ano para atendimento especializado em queimaduras (KEVIN et al., 2017). No Brasil, estima-se que ocorram em torno de 1 milhão de acidentes com queimaduras por ano, destes, 100 mil recebem atendimento hospitalar e, aproximadamente, 2.500 vão à óbito direta ou indiretamente como consequência das lesões (ANDRADE, CORDOVIL, BARREIROS, 2013).

Dentre os tipos de queimadura, a de 3º grau acomete 23,4% das pessoas queimadas. Apesar de sua taxa ser inferior quando comparada com as queimaduras de 1º e 2º graus, pode ser considerado um valor elevado, tendo em vista sua gravidade e comprometimentos sistêmicos (QUEIROZ, LIMA, ALCÂNTARA, 2013). As queimaduras de 3º grau causam lesões profundas, atingem a epiderme, derme e tecidos subjacentes. Pode causar comprometimento nervoso, de vasos sanguíneos e linfáticos e atingir tecido muscular e ósseo (SOUZA et al., 2014). As lesões cutâneas causadas pela queimadura refletem a importância do tecido cutâneo como primeira barreira de proteção mecânica e biológica do organismo. A perda desta barreira suscita feridas cutâneas, deixando o organismo exposto aos agentes externos e desencadeando processos infecciosos ou outras complicações sistêmicas (SOUSSI et al., 2018; OGAWA, 2011).

No entanto, não há estimativas confiáveis da prevalência e incidência de feridas crônicas ou não provenientes do processo de queimadura, pois este tema envolve diversos tipos e causas de lesões cutâneas, além de ser classificada em categorias heterogêneas (JARBRINK et al., 2016; MOORE et al., 2014).

Sequencial à queimadura, é desencadeado uma série de reações inflamatórias que iniciam o processo de reparação tecidual. Durante este processo, nova formação da proteína colágeno, o principal constituinte de estrutura, sustentação e resistência da pele é estimulada, assim como os processos de angiogênese (GILLITZER, GOEBELER, 2001; OGAWA, 2011).

A procura por uma terapia de reparação tecidual tem como propósito agilizar o fechamento de uma ferida e promover uma cicatrização funcional e estética. O processo de cicatrização é próprio do reparo tecidual e vários elementos estão relacionados à regeneração cutânea, podendo ocorrer desde cicatrização retardada à processos cicatriciais alterados como cicatrizes hipertróficas, quelóides, contraturas cutâneas ou capsulares (SOTO-PANTOJA et al., 2014; GILLITZER, GOEBELER, 2001).

Alguns recursos induzem uma melhor produção das fibras colágenas e possibilitam menor tempo de contração da ferida. Sendo assim, destaca-se a importância da Terapia de Fotobiomodulação (FBM) na formação mais rápida e de melhor qualidade do tecido cicatricial (LAU et al., 2015; CHUNG et al., 2012). A FBM apresenta diferentes comprimentos de onda que produzem os efeitos desejados em relação a reparação tecidual. Comumente, é encontrado na prática clínica os comprimentos de onda entre 658 e 940 nanômetros (nm) para tratamento de lesões cutâneas (TARAJAD et al., 2013).

Evidências científicas demonstram que a estimulação proveniente da FBM age nas fases inflamatórias e proliferativas da cicatrização, secundário à biomodulação dos eicosanoides, principalmente prostaglandina, e no sistema enzimático oxidativo cutâneo. Ao relacionar-se com células e tecidos, a FBM produz estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, aumento na produção de ATP mitocondrial e proliferação celular, atuando em fases do processo de reparação tecidual. Seu efeito bioestimulador, aumenta a circulação local, promove a angiogênese e modula a produção de fatores de crescimento em nível celular, ativando mudanças metabólicas, energéticas e funcionais, com secundário aumento da proliferação, resistência e vitalidade celular (CHUNG et al., 2012).

A FBM é utilizada em processo de regeneração tecidual, inclusive de lesões de queimadura de terceiro grau, visando modular a resposta inflamatória e acelerar o

processo de reparo tecidual (BRASSOLATI et al., 2018). Recentes investigações demonstram a possível influência positiva da FBM no processo de cicatrização cutânea, porém, existem várias controvérsias e grande variabilidade nos parâmetros de irradiação, além das discrepâncias nos achados biológicos.

Ainda são escassos, estudos que comparem os diferentes comprimentos de onda da FBM no tratamento de lesões de queimadura de 3º grau, de forma completa e padronizada. Há diferentes comprimentos de onda utilizados em vários artigos que abordam tratamento de lesões teciduais, especialmente entre 658nm e 904nm (LEITE et al., 2017; KESHRI et al., 2016; SOLEIMANI et al., 2018). A maior diferença entre estes comprimentos de onda refere-se a profundidade em que a luz emitida pela FBM atinge os tecidos, sendo 658nm de menor profundidade e espectro de luz vermelho e 830nm e 904nm de maior profundidade com espectro de luz infra-vermelho, que se diferem pela emissão contínua e pulsada da luz (CHUNG et al., 2012; AVCI et al., 2013; TARAJAD et al., 2013).

Considerando a FBM como um recurso já elucidado para cicatrização de feridas, mas ainda com inconsistência em relação aos parâmetros utilizados, é que se buscou realizar a presente pesquisa. A justificativa desta pesquisa está fundamentada no estudo desenvolvido por Avci et al. (2013) que especifica os diferentes comprimentos de onda da FBM com a profundidade que atingem o tecido. Como citado acima, no estudo de Avci et al. (2013) está claramente elucidado que, quanto maior o comprimento de onda, mais profundamente a luz exerce seu mecanismo de ação. Desta maneira, buscar entender se, para o processo de reparação tecidual após queimadura de 3º grau há maiores benefícios com os diferentes comprimentos de onda da FBM se torna importante para contribuir com o uso da mesma na prática clínica baseada em evidências.

Realizada em modelo animal, este estudo se utilizar-se-á de metodologias possíveis de excisão do tecido cutâneo e avaliação da qualidade do tecido neoformado após uma lesão secundária a queimadura de 3º grau. O estudo realizado em animais (ratos) permitirá análises histológicas com modelos semelhantes à estrutura humana. Além disso, apresenta maior disponibilidade, poucas necessidades específicas de bioterismo, pequeno porte, tempo de vida curto, comportamento dócil e fácil manuseio, justificando a escolha da pesquisa experimental.

Embasado neste contexto, surgiu a problematização e questão norteadora do presente estudo: qual o efeito dos diferentes comprimentos de onda da FBM no processo de reparação tecidual em lesões cutâneas após queimadura de 3º grau em modelos

animais? Acredita-se na hipótese de que, a FMB com comprimento de onda 658nm apresentará resultados mais satisfatórios, devido atingir tecidos mais superficiais.

Diante do exposto, justifica-se o estudo da efetividade da fotobiomodulação com diferentes comprimentos de onda durante as fases do processo de reparo tecidual, visto que a literatura, apesar de apresentar vários estudos com a FBM, ainda se verifica resultados inconclusivos em relação aos melhores parâmetros utilizados, especialmente em queimaduras de 3º grau.

Entende-se que o tecido cutâneo é o principal mecanismo de proteção mecânica do organismo, sendo necessário pesquisas que busquem as melhores alternativas de reabilitação e promoção adequada do reparo tecidual. Estudos realizados com animais permitem uma análise histológica mais efetiva do mecanismo de reparação tecidual, contribuindo para resultados mais fidedignos em relação a FBM utilizada. Além disso, o tecido cutâneo do animal utilizado na presente pesquisa apresenta modelos semelhantes à estrutura humana, apresenta maior disponibilidade, poucas necessidades específicas de bioterismo, pequeno porte, comportamento dócil e fácil manuseio.

Assim, estudos nesta linha, que buscam determinar parâmetros de estimulação da FBM com modelo animal, possibilitarão contribuir com os resultados para uma reabilitação com mais qualidade, em menor tempo e ainda diminuindo os gastos envolvidos no processo.

2 OBJETIVOS

Abaixo, seguem os objetivos geral e específicos do estudo.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos diferentes comprimentos de onda da Terapia de Fotobiomodulação (658nm, 830nm e 904nm) no processo de reparação tecidual em lesões cutâneas após queimadura de 3º grau, em modelos animais.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) avaliar os efeitos de diferentes comprimentos de onda da FBM (658nm, 830nm e 904nm) e da FBM simulada após queimadura de 3º grau em ratos, na análise de células inflamatórias, colágeno tipo III, vasos sanguíneos e temperatura cutânea superficial;
- b) analisar os efeitos da FBM sobre as variáveis de estudo nos grupos que receberam 658nm, 830nm, 904nm e FBM simulada nos diferentes dias de análise após queimadura: terceiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após a queimadura;
- c) comparar os resultados intra e inter-grupos nos animais que receberam FBM de 658nm, 830nm e 904nm e em animais que receberam FBM simulada, nos diferentes tempos de pesquisa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para compreensão do tema abordado na pesquisa, será apresentado a definição e fisiologia das queimaduras de 3º grau, o processo de reparo tecidual e o mecanismo de ação da Terapia de Fotobiomodulação.

3.1 Queimadura de 3º grau

Queimaduras são lesões traumáticas do tecido orgânico de origem térmica com perda da integridade cutânea e conseqüente alterações da homeostasia e mudanças nas condições mecano-fisiológicas dos tecidos, permitindo maior suscetibilidade do mesmo às agressões do meio externo. A gravidade de uma queimadura depende de sua profundidade, porcentagem de superfície cutânea lesada, tipos de lesão, regiões afetadas, agente causador e traumas associados (XUE et al., 2012).

As queimaduras são classificadas de acordo com a área de lesão e de acordo com a profundidade destas lesões. Em 1948, Polaski e Tennison, determinaram a regra dos nove como meio de classificação das queimaduras, dividindo a superfície corporal em segmentos que equivalem a, aproximadamente, 9% do total da área. Tal classificação é utilizada até hoje para determinar a porcentagem corporal lesionada e traçar um prognóstico da gravidade da lesão. Ainda, as queimaduras são classificadas de acordo com a profundidade que a lesão afeta os tecidos, sendo desde superficiais e menos graves à profundas e com alta gravidade, determinando o tratamento e o prognóstico do indivíduo (EVERS, 2010). As queimaduras superficiais, ou de primeiro grau, afetam epiderme e apresentam um quadro clínico de hiperemia local, dor, ausência de bolhas, sendo típica de queimaduras solares. Uma queimadura de nível intermediário, a de segundo grau, atinge a camada reticular da derme, além da epiderme, as queimaduras de terceiro grau, atingem toda pele e podem alcançar os tecidos subcutâneo, muscular e ósseo, apresentando uma lesão esbranquiçada e rígida. Devido a profundidade, necessita muitas vezes de enxertia, pois há ausência de tecido dérmicos para regeneração tecidual. Algumas sequelas, como necrose tecidual, lesões vasculares, fibrose e tecido cicatricial hipertrofiado e denso podem surgir (JOHNSON et al., 2003; ANDRADE et al., 2010; PORTAS et al., 2013).

Vale destacar que, a gravidade de uma queimadura depende de vários fatores, além da superfície e profundidade de lesão. A idade do paciente, profundidade da lesão,

tipos de lesões, regiões afetadas, agente causador, traumas associados (BRASSOLATTI et al., 2018).

As principais alterações fisiopatológicas sistêmicas decorrentes de queimadura são aumento da permeabilidade capilar, diminuição do volume circulante, aumento da viscosidade sanguínea e da resistência vascular periférica, choque hipovolêmico, hiperventilação, aumento do consumo de oxigênio e aumento do metabolismo. Algumas alterações locais como perda da primeira linha de defesa do organismo, que facilita a ação microbiótica e possíveis infecções, supressão da função imune proporcional à extensão da lesão e a liberação de agentes vasoativos e mediadores do processo inflamatório ocorrem após a queimadura (PORTAS et al., 2013).

3.2 Processo de reparação tecidual

O processo de reparo tecidual, subsequente a queimadura, se inicia imediatamente após a lesão cutânea com objetivo de formar nova estrutura e preservar a função do tecido normal. Estes eventos ocorrem de forma dinâmica e interativa, todavia, é possível diferencia-los em três fases distintas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (OGAWA, 2011).

A fase inflamatória é a fase inicial do processo de cicatrização e compreende eventos celulares e vasculares. Seguido do sangramento da lesão tecidual ocorre a agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e formação da rede de fibrina. Rapidamente sintetizadas após a lesão, as cininas e citocinas modulam a maioria dos eventos do processo inflamatório como aumento da permeabilidade vascular, migração celular, estímulo e inibição de produção celular, dor, hiperalgesia e calor (CHAMUSCA et al., 2012).

A histamina é liberada e tem como função dilatar arteríolas e aumentar a permeabilidade das vênulas. As prostaglandinas, em especial a PGE2 (sintetizada a partir da enzima Cicloxigenase-2 – COX-2) atuam como vasodilatadoras e promovem edema e eritema local, e os leucotrienos agem como vasoconstritores, atuam no extravasamento de plasma e recrutamento de leucócitos (CHAMUSCA et al., 2012; SAPIRSTEIN, BONVENTRE, 2000).

A presença do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) no sítio da lesão visa a homeostasia do local e estimula mediadores envolvidos na cicatrização, a fim de ativar macrófagos, fibroblastos e inúmeras células inflamatórias. A partir das primeiras

24 horas após a lesão, há a presença de leucócitos para a defesa celular e eliminação de partículas e microorganismos por fagocitose. Os macrófagos ligam-se à proteínas específicas da matriz extracelular e atuam na transição do processo inflamação-reparo, por meio dos receptores de integrina, estimulam a fagocitose e produzem fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador (TGF) α e β , e o fator de crescimento *insulin-like 1*, importantes para a migração e proliferação celular, angiogênese e formação da matriz extracelular (SHUKLA et al., 1998).

A reepitelização da ferida se inicia horas após a lesão. Inicialmente, os queratinócitos sofrem achatamento e alongamento para migrar das bordas íntegras do epitélio para o centro da lesão. Os queratinócitos interagem com a matriz provisória rica em fibronectina através de receptores de integrina na superfície das células, direcionando o processo de migração (SORG et al., 2017).

As células epidérmicas começam a migrar e se proliferar um a dois dias após a lesão. Não se sabe ao certo os estímulos que promovem este evento, todavia, a liberação local de fatores de crescimento associado ao aumento na expressão de receptores dos fatores de crescimento poderiam estimular o processo de proliferação e migração das células epidérmicas (SORG et al., 2017).

Seguida a fase inflamatória, inicia-se a fase proliferativa ou fibroplasia, caracterizada pela migração e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e outras proteínas que contribuem para a formação do tecido de granulação. Em torno do quarto dia, os leucócitos migram para a matriz provisória e iniciam a síntese de proteínas, transformando-a em matriz rica em colágenos, proteoglicanos e elastina. Os FGF e o TGF- β 1, associados a matriz extracelular, são responsáveis pelo estímulo dos fibroblastos em torno da ferida e a migração para a área de regeneração. Além destes, a diminuição do pH e da pressão parcial de oxigênio também estimulam a migração dos fibroblastos para a área de lesão (PHILIPS, 2000).

Nesta fase, o processo de angiogênese é iniciado para aumentar a nutrição e oxigenação local, por meio da ativação de células endoteliais, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular e reconstituição da membrana basal (SINGER, CLARK, 1999). Este processo é estimulado pelas citocinas, baixa concentração de oxigênio, aumento da concentração de ácido lático, presença de aminas produzidas na ferida em um estudo de Detmar et al. (1997), e por fatores como o FGF, TGF- β ,

angiopoetinas e, sobretudo, o VEGF (VEGF-A – vasos sanguíneos, VEGF-C – vasos linfáticos) (JOHNSON; WILGES, 2014).

Para o processo de contração da ferida, os fibroblastos são transformados em miofibroblastos pelo TGF- β 1 e pela presença de forças mecânicas na ferida. Além dos miofibroblastos, a contração da ferida também é mediada por uma série de fatores inflamatórios, incluindo TGF- β 2, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, bradicininas, epinefrina e norepinefrina; bem como por interações célula-célula e célula-matriz (MUDERA et al., 2002).

A última fase do processo de cicatrização, a fase de remodelamento, depende de variáveis como idade, estado nutricional, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo. Neste momento, ocorre substituição gradual do colágeno imaturo, tipo III, da matriz extracelular por colágeno maduro, tipo I, além da diminuição do número de células inflamatórias (ZHAO et al., 2014).

O colágeno representa cerca de 80% do peso seco da derme, com características de suporte, resistência e rigidez à pele. Dentre as fibras colágenas da derme saudável, cerca de 80% são representadas pelo tipo I e 10% do tipo III. No entanto, durante o processo cicatricial, após as primeiras 48 horas da lesão, o colágeno tipo III é inicialmente sintetizado, atingindo pico máximo entre 5 e 7 dias. Após o fechamento da ferida, ocorre substituição gradual das fibras colágenas tipo III em tipo I, caracterizada pelo maior alinhamento e ligações cruzadas entre as fibrilas. Essa substituição é conduzida pela enzima melanoproteinases, estimuladas durante o processo de cicatrização por citocinas, fatores de crescimento e pelo contato célula-matriz (ZHAO et al., 2014; VISSE, NAGASE, 2003).

3.3 Terapia de Fotobiomodulação

A fim de intensificar e favorecer o processo de cicatrização de lesões cutâneas, a aplicação de aparelhos que emitem LASER, Terapia de Fotobiomodulação, pode contribuir positivamente, em especial após queimaduras (LAU et al., 2014; YADAV et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016, BRASSOLATTI et al., 2016).

Anteriormente definida como *Low Level Light Therapy* (LLLT), teve seu uso iniciado em 1960. Em 2014, a *North American Association for Light Therapy*, alterou a nomenclatura buscando embasar cientificamente a técnica. Desta forma, Terapia de Fotobiomodulação se tornou um termo mais adequado que LLLT pois distingue uma

terapia não térmica, como vários outros recursos de tratamento por meio da luz. A FBM pode ser definida como terapia que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz incluindo *lasers*, Diodo Emissor de Luz (LED) e luz de amplo espectro, sendo visível ou infravermelho (ANDERS et al., 2015)

Segundo a *Europe Pressure Ulcer Advisory Panel* (EPUAP) e a *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP), um guia de tratamento sobre o uso da FBM no fechamento de feridas, afirma que várias formas de energia têm sido usadas para o processo de reparo tecidual (TARAJAD et al., 2013). A FBM, no espectro de luz vermelho e infravermelho (600 a 1000nm), promove efeito anti-inflamatório, alivia a dor e acelera o processo de reparação tecidual. Este mecanismo envolve cromóforos endógenos que provocam eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas (REDDY, 2004; MEIRELES et al., 2008; EZZATI et al., 2009; LINS et al., 2010; FIÓRIO et al., 2013; ANDERS e al., 2015; RODRIGO et al., 2009; MINATEL et al., 2009; DE ARAÚJO et al., 2007; DESMET et al., 2006; FIÓRIO et al., 2013).

A luz gerada pela FBM produz efeitos biológicos capazes de depositar energia luminosa sobre os tecidos e produzir efeitos primários (diretos), secundários (indiretos) e terapêuticos (REDDY, 2004; MEIRELES et al., 2008; EZZATI et al., 2009; LINS et al., 2010). Esta luz é absorvida pelos cromóforos celulares, em especial o citocromo C oxidase, localizado na mitocôndria celular e atua na cadeia de transporte de elétrons. Secundário a este estímulo, a FBM promove aumento da adenosina trifosfato (ATP), gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e libera óxido nítrico (Figura 1). Ao aumentar a ATP, ocorre aumento da síntese proteica, responsável pela proliferação e migração celular, modulação dos níveis de citocinas, estímulo dos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios e aumento da oxigenação celular (AVCI et al., 2013; CHUNG et al., 2012).

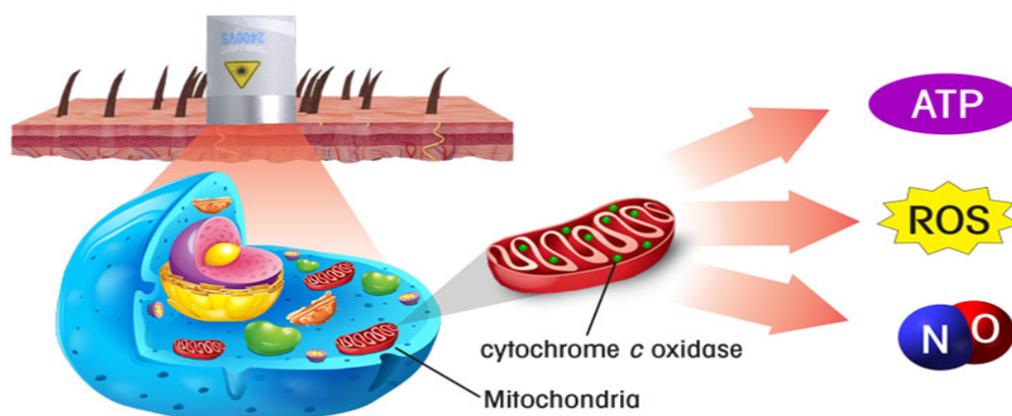


Figura 1 - Atuação da FBM na mitocôndria e liberação de ATP, ROS e óxido nítrico
Fonte: Adaptado de <https://responssystem.com/laser/laser-how-it-works/>.

A liberação das ROS induz a ativação dos fatores de transcrição, que impactam positivamente na reparação celular e cicatrização, pois promovem regulação de vários genes estimuladores relacionados a proliferação celular, migração e produção de citocinas e fatores de crescimento. A liberação de óxido nítrico, um potente vasodilatador, aumenta a circulação, diminui o processo de inflamação e melhora o transporte de oxigênio (CHUNG et al., 2012).

Além destes mecanismos, a FBM promove vasodilatação pelo relaxamento da musculatura lisa do endotélio vascular e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células e contribui para a reparação tecidual acelerada (CHUNG et al., 2012).

A FBM pode afetar as células imunes por promover degranulação dos mastócitos, resultando na liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α das células e conseqüente aumento do infiltrado de tecidos por leucócitos. Uma melhora na proliferação, maturação e motilidade dos fibroblastos também pode ser observado ao utilizar a FBM (CHUNG et al., 2012).

Não há, na literatura, uma padronização dos parâmetros utilizados na FBM para a regeneração do tecido cutâneo, em especial, em relação ao comprimento de onda.

A radiação produzida pela FBM emprega luz com comprimentos de onda entre 390–1.100nm, com característica de onda contínua ou pulsada. Comprimentos de onda na faixa de 390nm a 600nm são usados para tratar tecidos superficiais e comprimentos de onda maiores na faixa de 600nm a 1.100nm, penetram mais profundamente nos tecidos. Estudos que envolvem processo de reparação tecidual cutâneo utilizam mais comumente, comprimentos de onda de 658nm (Hélio-Neon – HeNe), 830nm (Arseneto de Alumínio e Gálio – GaAlAs) e 904nm (Arseneto de Gálio – GaAs) (AVCI et al., 2013; TARAJAD et al., 2013).

Como observa-se na Figura 2, a FBM com comprimentos de onda de 658nm, 830nm e 904nm atingem profundidade até o tecido subcutâneo, porém o de 658nm é mais superficial e apresenta espectro de luz vermelho. Os comprimentos de onda de 830nm e 904nm são mais profundos e apresentam espectro de luz infra-vermelho. A diferença entre 830nm e 904nm se refere a emissão contínua e pulsada das ondas, respectivamente (AVCI et al., 2013).

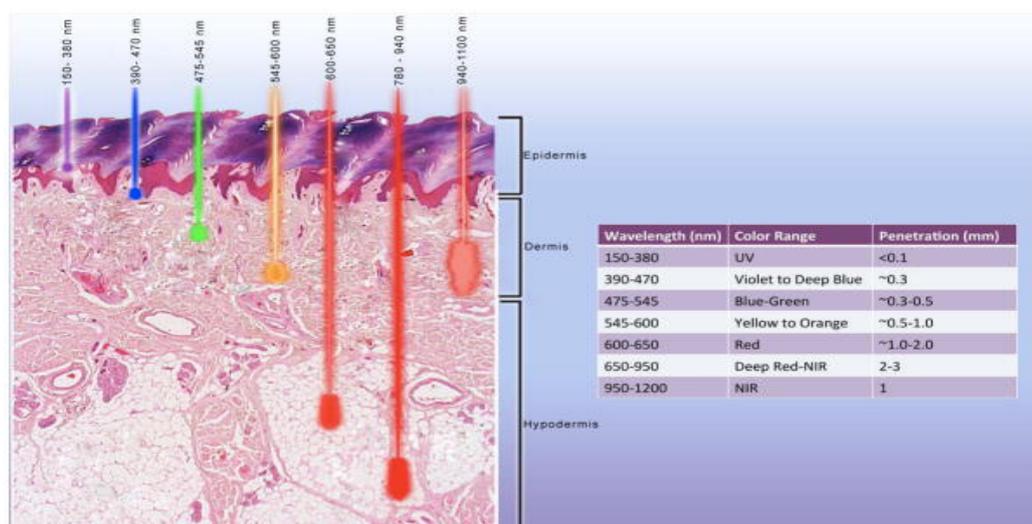


Figura 2 - Profundidade de penetração da luz emitida pela FBM nos diferentes comprimentos de onda

Fonte: AVCI et al., 2013.

Ao pesquisar a FBM de comprimento de onda mais curto (660nm), observa-se efetiva regeneração tecidual e maior liberação de fator de crescimento transformador (DE MELO RAMBO et al., 2014). Em estudo realizado com ratos, a FBM 904nm aplicado de forma pontual, se mostrou efetiva, pois reduziu a resposta inflamatória e foi capaz de aumentar a proliferação celular, deposição de colágeno e contração da ferida no processo de reparação de lesões de pele (GUPTA et al., 2014). De acordo com os autores, isso se deve ao comprimento de onda 904nm atingir mais profundamente o tecido lesionado, possibilitando o tratamento de feridas mais efetivamente, além disso, modula o metabolismo aeróbico, ativa e mantém a homeostasia do local da lesão (GUPTA et al., 2014; YADAV et al., 2016).

Todavia, em estudo clínico com humanos, os comprimentos de onda 660nm, 830nm e 904nm, com fluência média de 4 J/cm², foram testados na cicatrização de úlcera de pressão em 72 indivíduos, cinco vezes por semana, durante um mês e observou-se uma maior efetividade no fechamento, em relação a porcentagem de área de cicatrização, após aplicação da FBM 660nm, sendo que o efeito se manteve após *follow up* de três meses (TARAJAD et al., 2013).

Ao comparar os efeitos do comprimento de onda na cicatrização de lesões por queimadura de terceiro grau em ratos, observou-se que a FBM de 660nm resultou em efeitos positivos em fase inicial do processo inflamatório em relação a qualidade do tecido de granulação, proliferação dos fibroblastos, microcirculação e organização e deposição do colágeno quando comparado à 780nm (MEIRELES et al., 2008).

Para as queimaduras de terceiro grau, em publicação recente que utilizou a FBM de 660nm, comparando fluências de 38,2J/cm² e 76,4J/cm², houve aumento de mastócitos na fase inflamatória para ambas aplicações em queimadura de terceiro grau, porém a fluência de 38,2J/cm² foi mais efetiva (BAYAT et al., 2008). A aplicação de laser 890nm e fluência de 11,7J/cm² em queimaduras de terceiro grau também apresentou uma redução significativa da área da lesão e diminuiu, minimamente, a flora microbiana quando comparada ao controle e aplicação tópica de nitrofurazona a 0,2% (EZZATI et al., 2009).

Em revisão sistemática da literatura, foi avaliado os efeitos da FBM em úlceras de pressão e, o comprimento de onda de 658nm obteve 47% de melhora em relação ao demais comprimentos de onda estudados (808nm e 940nm) (MACHADO, VIANA, SBRUZZI, 2017).

Já Brassolatti et al. (2018), realizaram revisão sistemática da literatura com objetivo de analisar os efeitos da FBM no tratamento de queimaduras em modelo animal. Os autores observaram que há diversidade de protocolos, especialmente da potência, fluência e total de energia depositada para o tratamento das lesões. A FBM no espectro de luz vermelho foi mais comumente utilizada no tratamento das lesões com resultados positivos. A utilização da terapia pulsada também mostrou efetividade no tratamento de lesões após queimadura de 3º grau. Nos estudos avaliados houve concordância em relação a melhora da microcirculação local e proliferação celular, promovendo acelerado processo de reparação tecidual.

Embora sejam vistos resultados positivos com a FBM na reparação tecidual, vale destacar que há variações significativas em relação aos parâmetros de dosimetria como comprimento de onda, irradiância ou densidade de potência, estrutura de pulso, energia, fluência, tempo de irradiação, aplicação com ou sem contato e frequência de aplicação (BRASSOLATTI et al., 2018). Alguns estudos utilizando a FBM obtiveram resultados negativos, provavelmente, pela escolha inadequada de fonte de luz e dosagem (AVCI et al., 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODO

Foi conduzida uma pesquisa experimental, em modelo animal, de acordo com o percurso metodológico abaixo apresentado.

4.1 Modelo animal

Foram utilizados 128 ratos Wistar (machos, de 250g a 300g) provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia, sob condições controladas de temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG. O projeto foi encaminhado e aprovado pela CEUA sob parecer número 47/2016 (ANEXO I).

4.2 Modelo experimental – Queimadura de 3º grau

Todos os procedimentos foram realizados com agulhas e seringas esterilizadas. Para anestesia pré-cirúrgica foi utilizado Xilazina (10mg/Kg) e anestésico dissociativo quetamina (90mg/Kg). Quando necessário, foi utilizado a metade do volume mãe das duas substâncias para prolongar o efeito anestésico. Após anestesiados, os animais foram posicionados sobre o campo operatório, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. Foi realizada a tricotomia com aparelho Santinelli (Phillips®) em região dorsal (8cmX6cm) do animal, em seguida, realizada a antissepsia com álcool 70° no local onde a queimadura foi realizada. A queimadura foi realizada na região dorsal do animal, entre as escápulas.

Para o processo de queimadura na pele do animal, uma placa de ferro de 3cm de diâmetro foi soldada a aparelho de aquecimento com tensão de 127 a 220 Volts, 60Hz e potência de 22W e temperatura máxima atingida de 200°C foi utilizada (Figura 3).



Figura 3 - Placa de ferro acoplada a resistência para gerar aquecimento
Fonte: Do autor.

Para promover lesão de queimadura de 3º grau na pele dos animais, foi utilizada a metodologia desenvolvida por de Andrade et al. (2017). Neste estudo, dezoito ratos machos wistar foram aleatoriamente divididos em três grupos, um ferro de solda acoplado a uma placa de alumínio foi usado para produzir queimaduras, a uma temperatura de 150°C, com diferentes tempos de exposição por grupo. Os animais foram queimados a 150 °C com tempo de exposição de 5, 10 e 15 segundos. O tecido queimado foi coletado trinta minutos após a aplicação do protocolo, a amostra de tecido da área lesionada foi devidamente processada e corada com hematoxilina e eosina e analisada por microscopia com uma lente de aumento de 100x. Os resultados mostraram que todos os três grupos apresentaram características, com envolvimento total da espessura (parâmetros morfológicos que confirmaram a lesão de 3º grau), portanto não há necessidade de usar tempos prolongados para indução de lesão, porque em apenas 5 segundos a lesão desejada é obtida com características morfológicas como as encontradas por mais tempo, como 10 e 15 segundos. Esse estudo citado forneceu um protocolo comprovado, seguro e eficiente sobre a metodologia empregada nessa pesquisa.

Desta maneira, para promover a queimadura de 3º grau nos animais da presente pesquisa, a placa de ferro foi aquecida até atingir uma temperatura de 150°C, avaliada por meio de termômetro infravermelho (medidor de temperatura digital de -50 a 380°C) e pressionada sobre a pele do animal por 5 segundos (Figura 4).



Figura 4 - Área de lesão após procedimento de queimadura
Fonte: Do autor.

Com o intuito de evitar possíveis interferências dos outros animais ainda não operados, como mordeduras na área cruenta, ao término do ato operatório cada rato foi colocado em gaiola isolada, com *pellet* de ração e uma vasilha pequena com água no chão da caixa para facilitar o acesso nos primeiros dias de pós-operatório.

Foi administrado medicação analgésica, seguindo a posologia: Buprenorfina (Temgesic® – concentração de 0,3mg/ml) na dose de 0,05mg/Kg aplicadas por via subcutânea a cada 12 horas por 5 dias associada ao Carprofeno 2,5mg/Kg por via subcutânea uma vez ao dia, por 3 dias.

Durante todo o período pós-operatório, até o dia da eutanásia, foi realizada avaliação clínica diária das feridas cirúrgicas, para monitorar complicações locais como infecções, ingestão de água e ração, variação de peso corporal, estado geral e postura, comportamento e vocalização e secreção ocular (porfirina).

4.3 Protocolo de tratamento com FBM e grupos de estudo

Os animais foram randomizados em quatro grupos: um grupo que recebeu FBM de 658nm (G658), um grupo que recebeu FBM de 830nm (G830), um grupo que recebeu FBM de 904nm (G904) e um grupo controle que recebeu FBM simulada (GC).

Foi utilizado o aparelho de emissão de luz da HTM Compact® (Amparo, SP, Brasil, Registro Anvisa: 80212480005) com frequência de tensão de alimentação de 60Hz

e corrente máxima de 54mA, permitindo fluência programada de 0,5 a 15 J/cm², utilizando as canetas de comprimento de onda de 658nm, 830nm e 904nm.

O Quadro 1 apresenta os parâmetros usados para a aplicação da FBM.

Quadro 1 - Parâmetros de aplicação da FBM, nos grupos estudados

Parâmetros	Grupos		
	G658	G830	G904
Densidade de energia	4 J/cm ²	4 J/cm ²	4 J/cm ²
Potência de pico	30 mW	30 mW	50 W
Potência média	0,03 W	0,03 W	0,02 W
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo	Pulsado
Largura do feixe	0,125 cm ²	0,125 cm ²	0,125 cm ²
Tempo de irradiação (por ponto)	16,6 sec	16,6 sec	25 sec
Taxa de repetição do pulso	-	-	5000 Hz
Tempo de emissão da luz	-	-	800 ns

A caneta de 658nm apresenta espectro eletromagnético vermelho (visível) e as de 830nm e 904nm, infra-vermelho (invisível). Todas as canetas apresentam área de feixe de 12,566mm² e foram programadas para gerar fluência de 4J/cm² (BRASSOLATTI et al., 2018; DE MEDEIROS et al., 2017).

Antes de todas aplicações da FBM foi realizado o *Test Laser* que gera sinal sonoro e indica que o laser está sendo emitido. A aplicação da FBM foi realizada de maneira pontual (SOLEIMANI et al., 2018), com o probe em contato perpendicular à área de lesão, em 8 pontos na borda e um ponto no centro da ferida, conforme a Figura 5. Entre o probe e a área de lesão foi acoplado um plástico transparente e estéril para proteção.

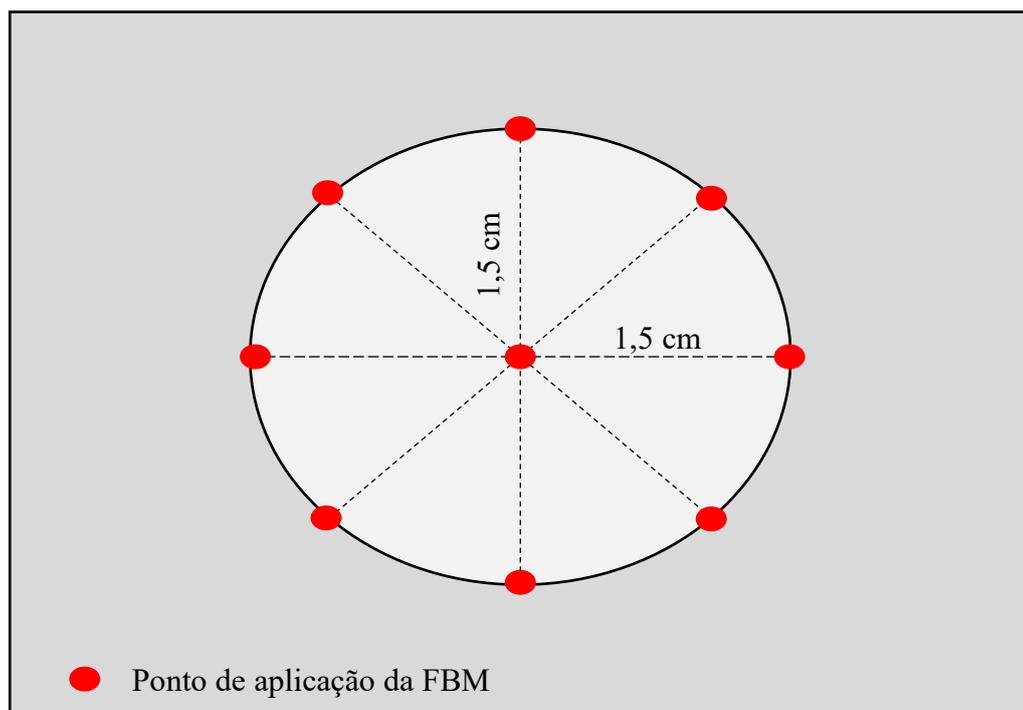


Figura 5 - Pontos de aplicação da FBM
Fonte: Do autor.

As aplicações de FBM nos comprimentos de onda 658nm, 830nm e 904nm e a aplicação simulada no GC foram realizadas três vezes na semana, em dias alternados. Para cada grupo de tratamento, a eutanásia e coleta de dados aconteceu em quatro diferentes tempos de pesquisa: 3º dia após queimadura (3PO), 7º dia após queimadura (7PO), 14º dia após queimadura (14PO) e 21º dia após queimadura (21PO). O Quadro 2 sintetiza a divisão dos grupos, os tempos de pesquisa, número de aplicação da FBM e momento da eutanásia.

Quadro 2 - Grupos estudados, tempos de pesquisa, momento da eutanásia e número de aplicação da FBM

Fonte: Do autor.

Grupo	Tempo (nº de animais)	Eutanásia	nº de aplicações FBM
G658	3PO (n=6)	3 dias após queimadura	1 aplicação
	7PO (n=6)	7 dias após queimadura	3 aplicações
	14PO (n=6)	14 dias após queimadura	6 aplicações
	21PO (n=6)	21 dias após queimadura	9 aplicações
G830	3PO (n=6)	3 dias após queimadura	1 aplicação
	7PO (n=6)	7 dias após queimadura	3 aplicações
	14PO (n=6)	14 dias após queimadura	6 aplicações
	21PO (n=6)	21 dias após queimadura	9 aplicações
G904	3PO (n=6)	3 dias após queimadura	1 aplicação
	7PO (n=6)	7 dias após queimadura	3 aplicações
	14PO (n=6)	14 dias após queimadura	6 aplicações
	21PO (n=6)	21 dias após queimadura	9 aplicações
GC	3PO (n=6)	3 dias após queimadura	1 aplicação
	7PO (n=6)	7 dias após queimadura	3 aplicações
	14PO (n=6)	14 dias após queimadura	6 aplicações
	21PO (n=6)	21 dias após queimadura	9 aplicações

Para a eutanásia os animais receberam dose letal de anestésico. O modelo de delineamento do estudo está apresentado na Figura 6.

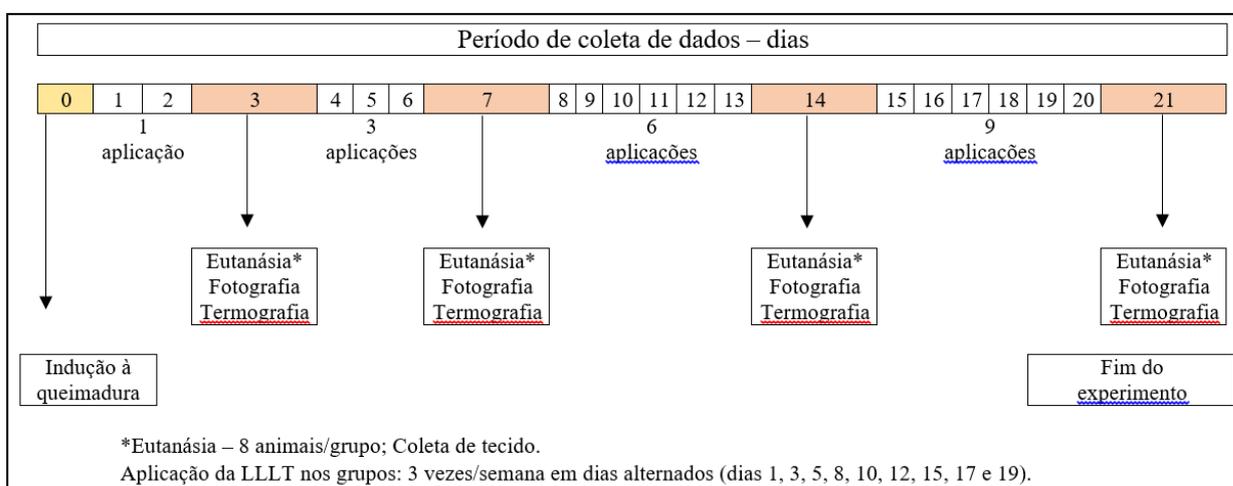


Figura 6 - Modelo de delineamento do estudo

Fonte: Do autor.

4.4 Avaliação dos resultados

Após a eutanásia dos animais com dose dobrada de Xilazina (20mg/Kg) e quetamina (180mg/Kg), os animais dos grupos estudados foram analisados nos diferentes tempos de pesquisa pela temperatura cutânea superficial, vasos sanguíneos, colágeno e células inflamatórias.

4.4.1 Análise Histológica para avaliação das células inflamatórias, colágeno tipo III e vasos sanguíneos

Para cada grupo, nos diferentes tempos de pesquisa (3PO, 7PO, 14PO e 21PO), foi extraído cirurgicamente, amostras de pele de aproximadamente 2cm², contendo a região da borda da lesão cutânea, composto por um fragmento de pele saudável (área de 1cm x 1cm) e a área da lesão propriamente dita (área de 1cm x 1cm). Após as coletas, as amostras foram fixadas em formalina por 24 horas e armazenadas em álcool 70%, para as análises histológicas.

Para o processo de parafinização das amostras e fixação em lâminas histológicas, os espécimes extraídos da área tratada e ao redor foram lavadas em água corrente e submetidas ao processo de desidratação pelo álcool etílico 70%, 90% e 100%, durante uma hora em cada. Após os banhos, foi realizado a diafanização das peças em solução álcool/xilol (1:1) seguido por dois banhos de xilol puro. Seguindo, as amostras foram incluídas em parafina e cortadas em micrótomo rotatório (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany), longitudinalmente, com espessura padronizada de 5µm. Foi coletado 1 a cada 20 cortes (4 cortes por lâmina) para evitar a avaliação da mesma área histológica (NOVAES et al., 2014). Todas as análises histológicas foram realizadas no mesmo período, de forma aleatória, sob as mesmas condições de regulação e calibração do aparelho.

4.4.1.1 Contagem de células inflamatórias

Para a contagem de células inflamatórias, após o processamento do tecido e parafinização e finalmente secções dos cortes, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico da marca Olympus BH-2 com uma lente ocular de 10x e objetiva de 100x totalizando um

aumento de 1000x, por um avaliador cego. As imagens histológicas foram capturadas em câmera digital (AxionVision – AxioCam ICC 3). As imagens foram capturadas com a utilização do programa Toup View For Digital Camera 3.7. Na derme, foram obtidas 6 fotos aleatórias dentro da área lesionada para cada lâmina. Todas as imagens digitais foram analisadas a partir do software ImagePro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA), para a quantificação de celularidade foi padronizado uma área total igual para todas as fotos (área total: 15857.33) e então contabilizado a quantidade de células inflamatórias por foto.

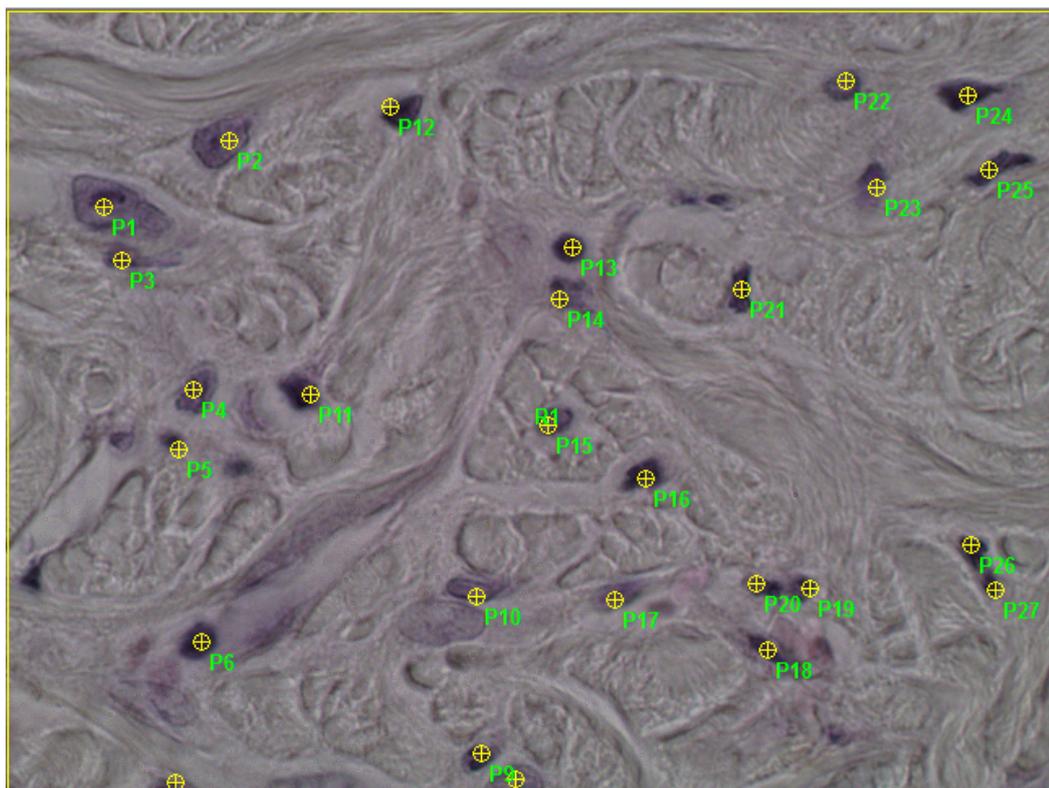


Figura 7 - Demonstração contagem das células inflamatórias por área pré-determinada para cada foto das lâminas nos grupos estudados

Fonte: Do autor.

4.4.1.2 Análise de Birrefringência do colágeno tipo III

O método consistiu na identificação e quantificação das fibras colágenas imaturas (tipo III) por técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se cortes transversais na porção média da ferida incisional e

excisional. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias (5 μ m) e subsequente coloração com picrossirius-red F3BA.

As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico da marca Olympus BH-2 com uma lente ocular de 10x e objetiva de 40x totalizando um aumento de 400x, por um avaliador cego. Imagens histológicas foram capturadas em câmera digital com a utilização do programa de análise de imagens (AxionVision – AxioCam ICC 3). As imagens foram capturadas com a utilização do programa Toup View For Digital Camera 3.7. Na análise histológica de cada área cicatricial, 8 campos de grande aumento (400 vezes) foram aleatoriamente selecionados para a quantificação do colágeno tipo III. A média destas 8 análises foi considerado como valor final para cada animal. Todas as imagens digitais foram analisadas a partir do software ImagePro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA).

No sistema RGB (Red, Blue, Green) foi considerado valores para tons de vermelho e laranja (colágeno imaturo tipo III) e para os tons de verde (colágeno maduro tipo I) (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003).

Para a quantificação de colágeno, também foi utilizado a grade com 100 pontos de intersecção padronizada para área fotografada e contabilizado apenas as fibras imaturas de cor alaranjadas ou vermelhas que passavam por estes pontos de intersecção (figura 8).

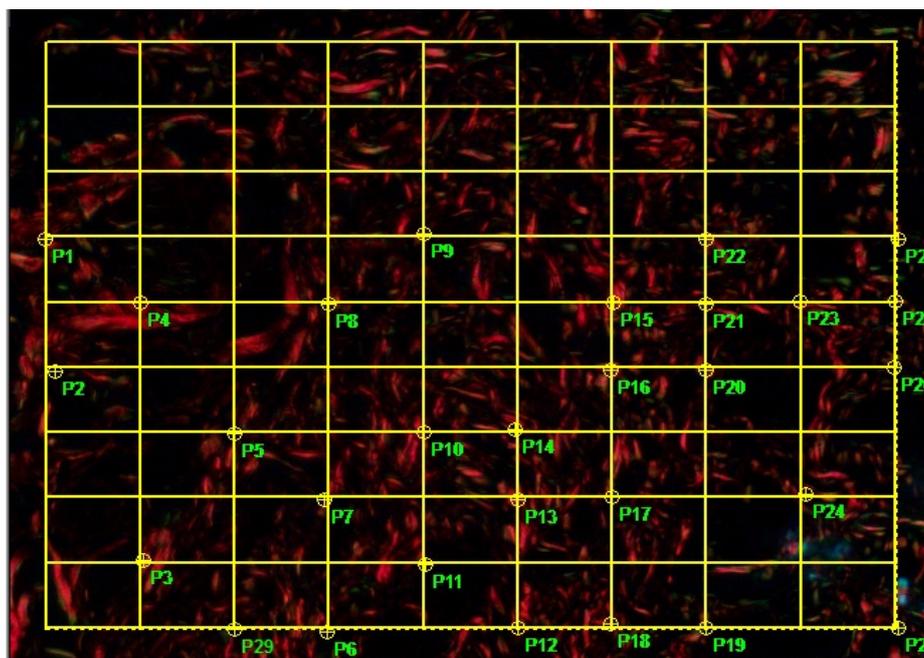


Figura 8 - Demonstração da grade de 100 pontos para quantificação de colágeno
Fonte: Do autor.

4.4.1.3 Morfometria dos vasos sanguíneos

Após ser realizado a devida preparação descrita acima, para as análises de quantificação de vasos sanguíneos da derme (neovascularização) os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico da marca Olympus BH-2 com uma lente ocular de 10x e objetiva de 40x totalizando um aumento de 400x, por um avaliador cego. Imagens histológicas foram capturadas em câmera digital com a utilização do programa de análise de imagens (AxionVision – AxioCam ICC 3). As imagens foram capturadas com a utilização do programa Toup View For Digital Camera 3.7. Na derme, foram obtidas 8 fotos aleatórias dentro da área lesionada para cada lâmina. Todas as imagens digitais foram analisadas a partir do software ImagePro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA), para a quantificação de vasos foi padronizado uma grade contendo 100 pontos de intersecção (fornecida pelo próprio software de análise) dentro da área da foto e foi contabilizado apenas os vasos que passavam por estes pontos (Figura 9).

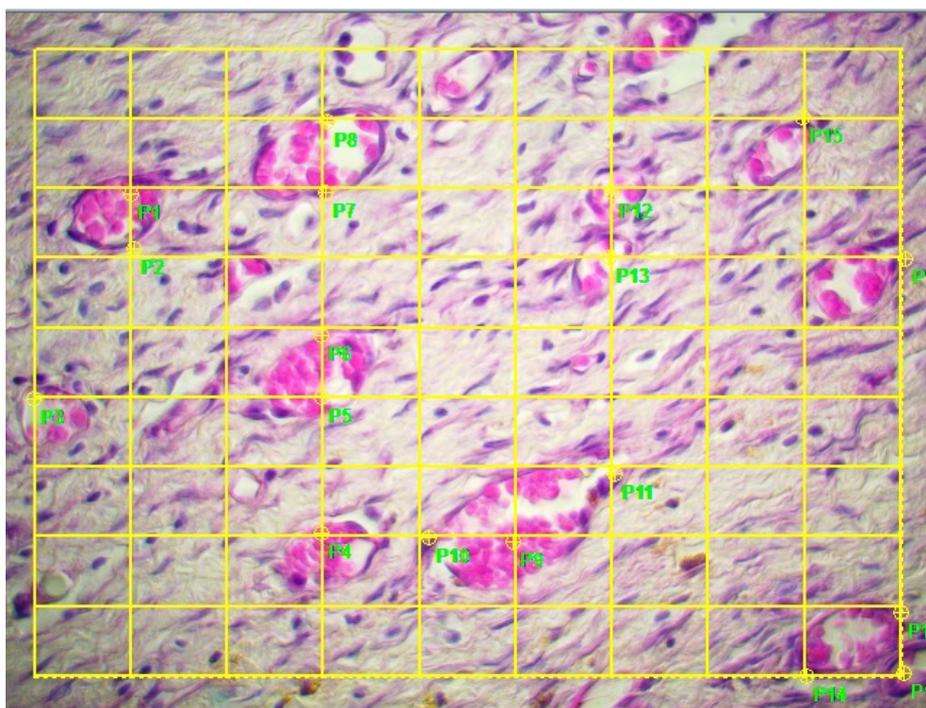


Figura 9 - Demonstração da grade de 100 pontos para quantificação de vasos
Fonte: Do autor.

Para a morfometria dos vasos, considerou-se todos os vasos presentes na amostra durante a contagem. Após a contagem, foi estabelecido uma média para cada animal,

proveniente das 8 fotos. Este resultado será utilizado para determinar a média do número de vasos de cada grupo de estudo e considerada para a análise estatística (BOSSINI et al., 2009; NUNEZ et al., 2013).

4.4.2 Temperatura Cutânea Superficial

Para a avaliação da temperatura cutânea superficial, foi utilizado a termografia infravermelha, um exame complementar de imagem. A termografia cutânea por imagem infravermelha analisa a distribuição da temperatura cutânea, refletindo a dinâmica microcirculatória da superfície em tempo real (BRIOSCHI et al., 2003).

Foram coletadas imagens dos animais antes do procedimento de queimadura de 3º grau. Após a primeira captura de imagem, foi realizada a aleatorização dos animais. As imagens termográficas foram capturadas também no 3º, 7º, 14º e 21º dias de análise após queimadura, antes da eutanásia do animal. Todas as imagens foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos.

Para captação das imagens termográficas foi utilizado uma câmera de infravermelho da marca Flir Systems® com processamento digital de imagens, sensibilidade térmica de 0,08°C em faixa espectral de 3 a 14 micrômetros.

A fotografia infravermelha foi realizada com o animal ainda vivo, a fim de não alterar sua temperatura corporal. O mesmo recebia uma dose de anestésico, a fotografia era realizada e, em seguida, dose dobrada era administrada para a eutanásia (quando imagem para análise dos 3º, 7º, 14º e 21º dias de análise após queimadura). Foi aguardado um período de 15 minutos de exposição do animal na sala de coleta para que a pele entrasse em equilíbrio térmico com a temperatura da sala e, posteriormente ser feito o registro termográfico. As imagens foram captadas em sala com temperatura ambiente de 23°C, ausência de luz solar e iluminação por lâmpadas de luz fria (fluorescentes) (BRIOSCHI et al., 2003).

Para a fotografia, a câmera termográfica foi posicionada a uma distância de 15 cm do dorso do animal, que permanecia na mesa cirúrgica em decúbito ventral. Uma caixa de isopor, com altura de 15cm e um orifício para acoplamento da câmera foi utilizada (Figura 7-A). O animal permanecia dentro da caixa e uma imagem por animal foi registrada.

Para a análise das imagens foi utilizado o software de suporte Velocity 2.3 com calibração automática. As imagens eram exportadas ao software e realizado o contorno

da lesão. O valor registrado refere-se a média de temperatura de toda a área de lesão, determinada pelo programa de análise (Figura 7-B).

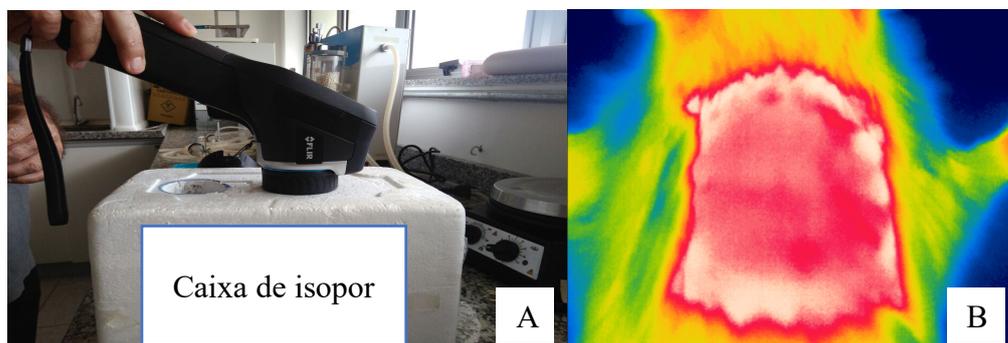


Figura 10 - A – Metodologia de captura de imagens da câmera termográfica infravermelha.
B – Imagem visualizada no software de análise

Fonte: Do autor.

4.5 Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilha e criado banco de dados no aplicativo Excel. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão para cada variável nos diferentes tempos estudados. Após atestar normalidade dos dados com teste de Shapiro-Wilk, foi aplicado teste ANOVA Two-Way e utilizado o teste de Bonferroni para determinar as diferenças entre as variáveis células inflamatórias, colágeno tipo III, vasos sanguíneos e temperatura cutânea superficial inter e intra-grupos estudados.

Para a comparação da temperatura cutânea registrada antes do procedimento cirúrgico com os dias de análise após queimadura (3º, 7º, 14º e 21º dias) em cada grupo de estudo, separadamente, foi utilizado o teste t de Student.

Foi realizada correlação das variáveis células inflamatórias, colágeno tipo III, vasos sanguíneos e temperatura cutânea superficial nos diferentes dias de análise após a queimadura, em cada grupo de estudo, pelo teste de Pearson. Para a análise, foi considerado valor de Pearson (r) de 0.9 a 1,0 positivo ou negativo indica correlação muito forte; de 0.7 a 0.9 positivo ou negativo indica correlação forte; de 0.5 a 0.7 positivo ou negativo indica correlação moderada; de 0.3 a 0.5 positivo ou negativo indica correlação fraca; de 0 a 0.3 positivo ou negativo indica correlação desprezível.

Para as análises estatísticas, os dados foram transportados ao Programa Estatístico Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0 e nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Após a coleta de dados, seis animais de cada grupo foram analisados. Durante e após a aplicação de todos os procedimentos de pesquisa, nenhum dos animais apresentou, visualmente, sinais de inflamação e/ou infecção ao redor da lesão ou qualquer outra complicação.

5.1 Células inflamatórias

Após as análises das células inflamatórias, observou-se uma diferença significativa intragrupos no G658 ($p=0,006$) e no G904 ($p<0,0001$). Após teste de comparação de Bonferroni, o G658 apresentou diminuição significativa das células inflamatórias entre o 3PO e o 21PO ($p=0,006$; IC95% = 0,2 – 17,6). Assim como o G904 mostrou redução do número de células inflamatórias do 7PO para o 21PO ($p=0,005$; IC95% = 1,2 – 7,5).

Entre os grupos, foi possível observar uma alteração estatística significativa no 3PO, 14PO e 21PO. Em 3PO, o G658 teve número significativamente maior de células inflamatórias quando comparado ao GC ($p=0,003$; IC95% = 13,9 – 2,7); em 14PO, o G904 apresentou número maior de células inflamatórias comparado ao G830 ($p=0,003$; IC95% = 2,5 – 25,2) e; em 21PO a diferença significativa mostrou aumento do número de células no GC comparado ao G658 ($p=0,03$; IC95% = 4,2 – 24,7).

O Gráfico 1 apresenta os diferentes grupos analisados e os dias de análise após a queimadura, em relação as células inflamatórias.

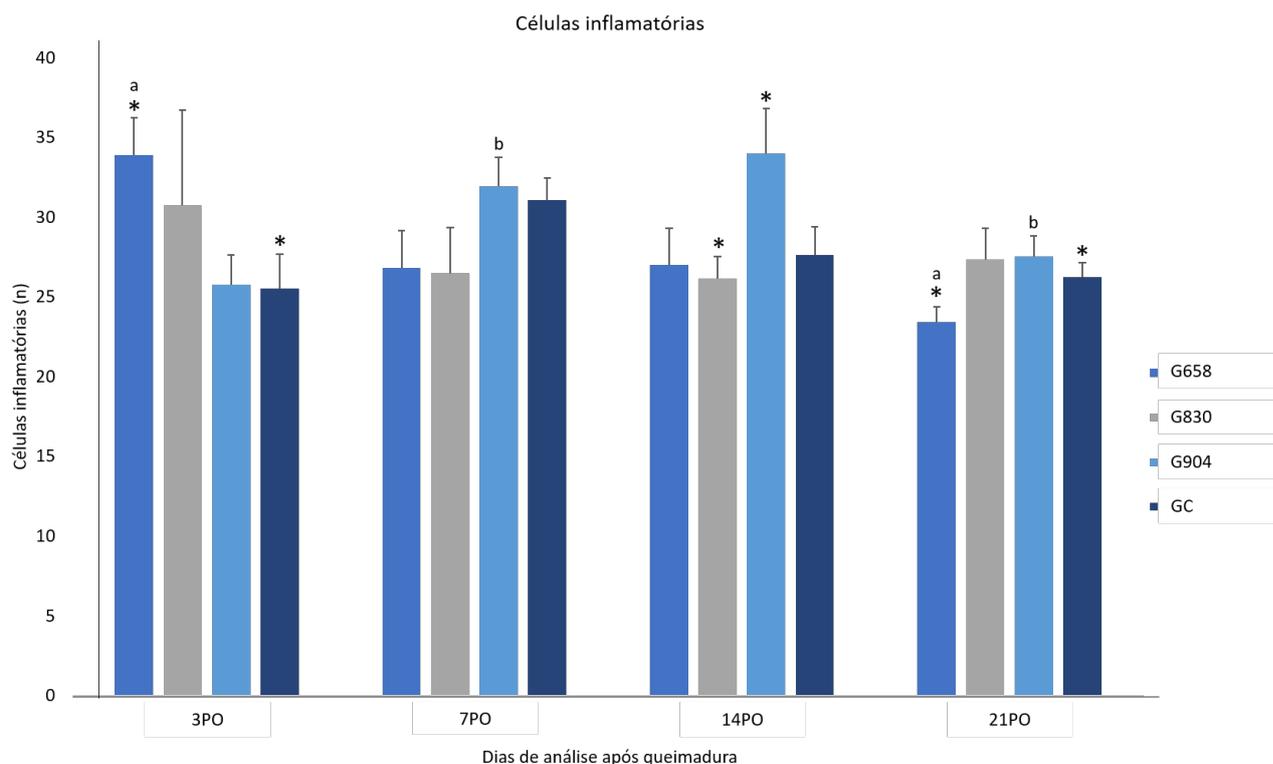


Gráfico 1 - Resultados do número de células inflamatórias nos terceiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.
 G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.
 G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm.
 GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura.
 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura.
 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.

^{a, b}Análise intragrupos: $p < 0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

*Análise intergrupos: $p < 0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

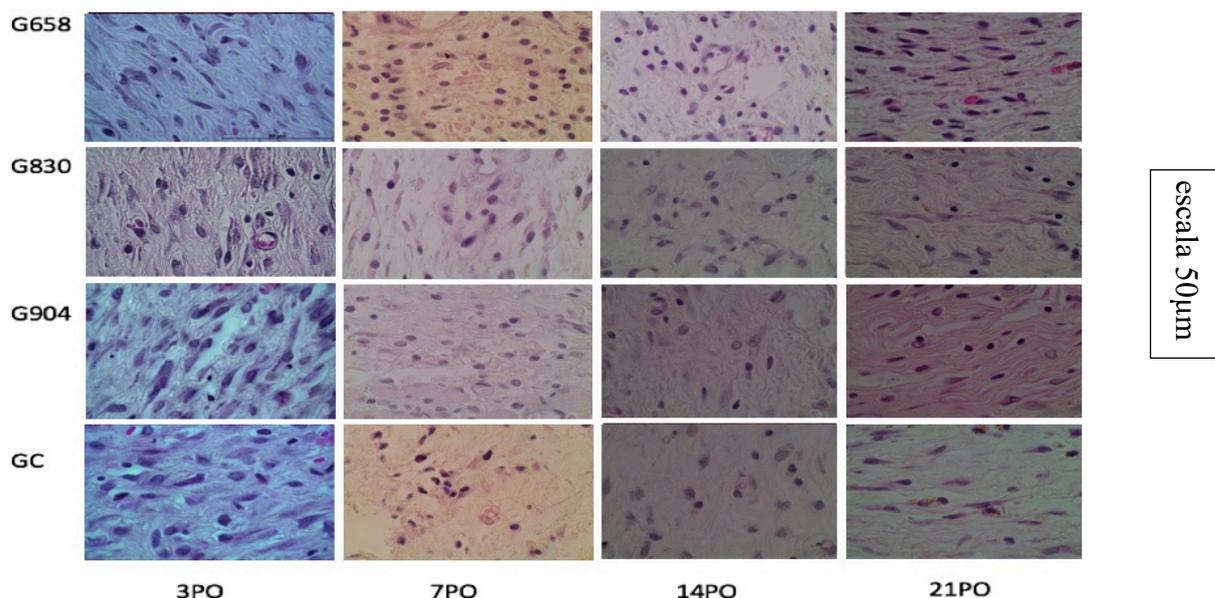


Figura 11 - Resultados da microscopia (100x) dos tecidos lesionados corados com H&E

Fonte: Do autor.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura. 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura. 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.

5.2 Colágeno

Após a análise do colágeno tipo III, apenas o G904 não apresentou diferenças significantes intragrupos, diferenças foram encontradas no G658 ($p < 0,0001$), G830 ($p = 0,02$) e GC ($p < 0,0001$). No G658, o dia de análise 3PO após a queimadura teve número significante maior de colágeno tipo III quando comparado ao 14PO ($p < 0,0001$; IC95% = 3,4 – 8,2) e 21PO ($p < 0,0001$; IC95% = 3,4 – 8,5). Ainda, no G658, o 7PO teve maior número de colágeno tipo III quando comparado ao 14PO ($p < 0,0001$; IC95% = 2,5 – 5,9) e ao 21PO ($p = 0,001$; IC95% = 2,2 – 6,4), após teste de Bonferroni.

O G830, mostrou redução significativa do colágeno tipo III do 3PO para o 7PO ($p = 0,02$; IC95% = 0,3 – 5,8). No GC, os 7PO ($p < 0,0001$; IC95% = 2,2 – 4,8) e 21PO ($p = 0,04$; IC95% = 0,04 – 5,9) apresentaram número menor de colágeno tipo III em relação ao 3PO.

Na análise intergrupos, os dias de análise 3PO ($p = 0,004$) e 7PO ($p < 0,0001$) apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Após teste de comparação de Bonferroni, em 3PO, o G658 apresentou maior número de colágeno tipo III comparado

aos G830 ($p=0,01$; IC95% = 0,8 – 6,6), G904 ($p<0,0001$; IC95% = 3,0 – 6,7) e GC ($p=0,02$; IC95% = 0,4 – 6,0).

No 7PO, os G830 ($p=0,04$; IC95% = 2,0 – 8,4), G904 ($p=0,005$; IC95% = 1,4 – 6,0) e GC ($p<0,0001$; IC95% = 2,9 – 7,3) tiveram número significativamente menor de colágeno tipo III comparado ao G658. Neste dia de análise após queimadura, o G904 também teve maior número de colágeno tipo III comparado ao GC ($p=0,04$; IC95% = 2,8 – 0,02).

O Gráfico 2 apresenta as análises intra e intergrupos após queimadura nos dias de análise do colágeno tipo III.

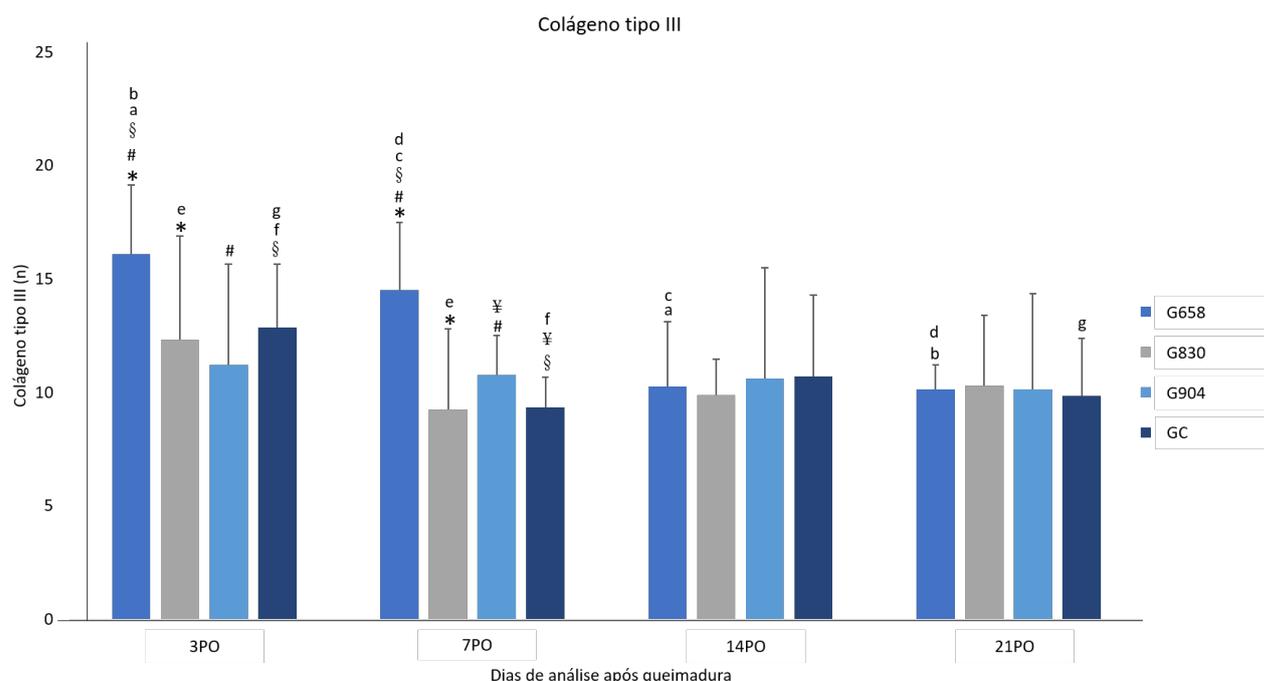


Gráfico 2 - Resultados relacionados ao colágeno tipo III nos terceiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.
 G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.
 G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm.
 GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura.
 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura.
 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.

a, b, c, d, e, f, g Análise intragrupos: $p<0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

*, #, \$, ¥ Análise intergrupos: $p<0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

As fibras de colágeno tipo III foram avaliadas de acordo com suas propriedades de birrefringência sobre polarização. Na Figura 12 é observado a coloração vermelha, portanto colágeno imaturo no processo de cicatrização.

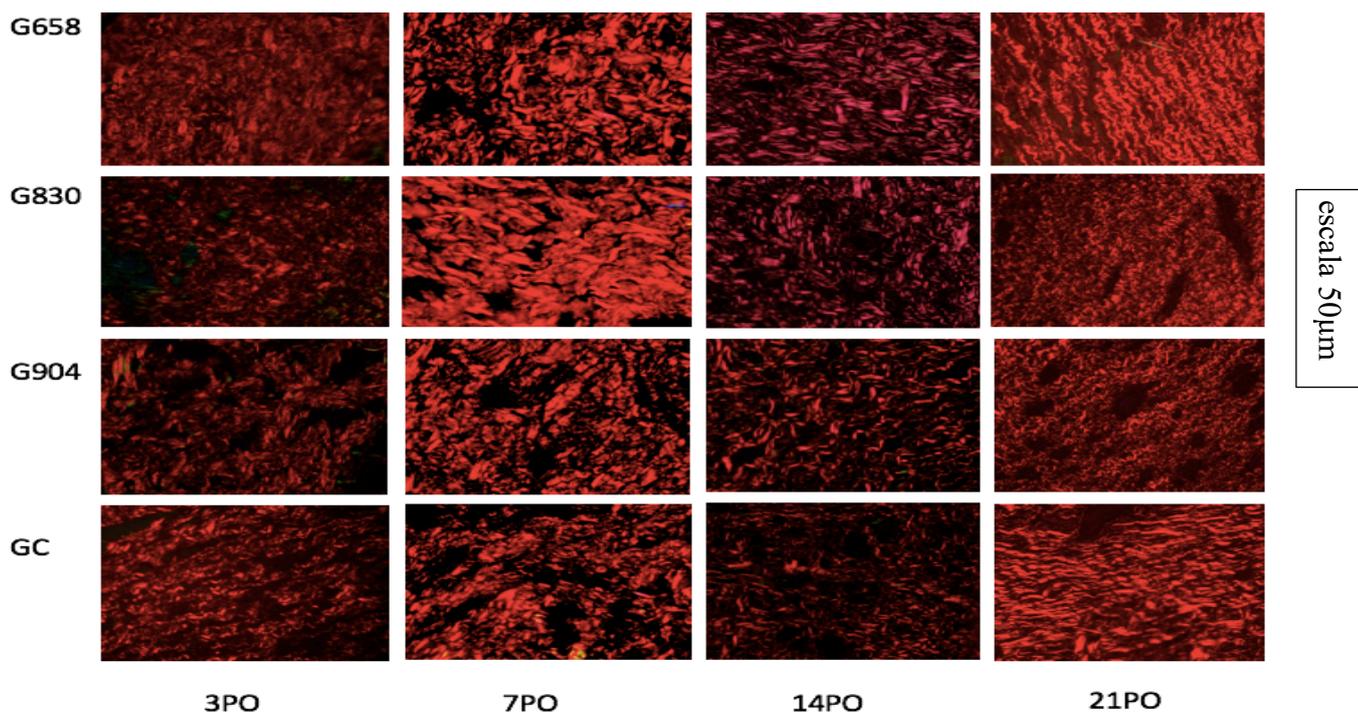


Figura 12 - Resultados da microscopia dos tecidos lesionados corados com Picrossirius-red

Fonte: Do autor.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.

G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.

G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC:

Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura.

7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura. 21PO:

vigésimo primeiro dia após queimadura.

Pela Figura 12 é possível notar a deposição do colágeno tipo III nos grupos estudados. Uma observação importante relaciona-se a maior organização das fibras colágenas depositadas no G658, especialmente em 21PO.

5.3 Vasos sanguíneos

Em relação ao número de vasos sanguíneos, o Gráfico 3 apresenta os valores nos grupos estudados nos diferentes tempos de pesquisa. Observa-se que, intragrupos, não houve diferença significativa entre as avaliações de 3PO, 7PO, 14PO e 21PO para nenhum dos grupos.

Para a análise inter-grupos, após aplicar o teste de Bonferroni, em 7PO, há diferença significativa dos vasos entre G658 e GC ($p=0,03$; IC95% = 0,2 – 8,4), sendo que o G658 apresentou aumento de vasos sanguíneos em relação ao GC. Em 21PO, o

G658 mostrou maior número de vasos sanguíneos em comparação ao G904 ($p=0,02$; IC95% = 0,8 – 11,2) e GC ($p=0,005$; IC95% = 2,0 – 12,4).

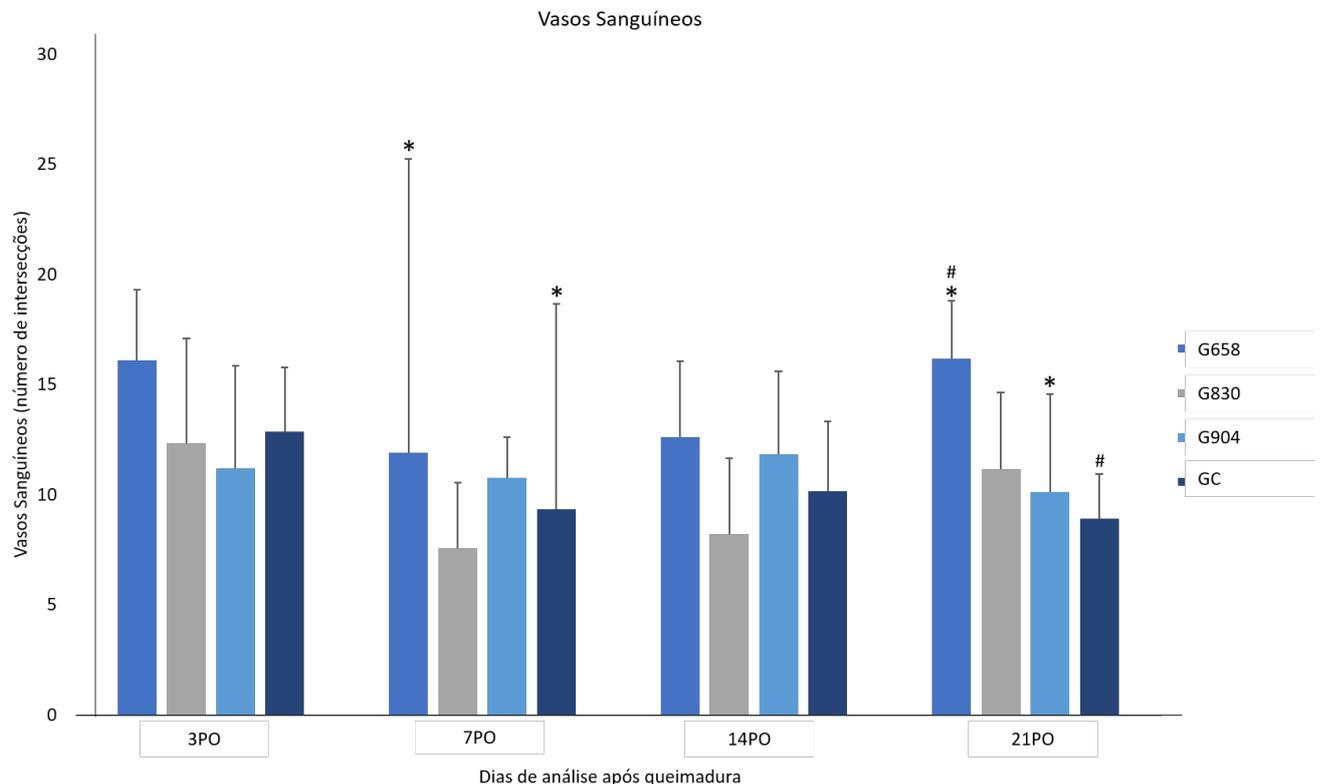


Gráfico 3 - Resultados do número de intersecções encontradas na análise dos vasos sanguíneos nos terceiros, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.
 G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.
 G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm.
 GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura.
 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura.
 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.
 *,#Análise intergrupos: $p<0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

Pela Figura 13, observa-se o processo de vasodilatação, com vasos de diâmetro aumentado em comparação ao 21º dia pós queimadura, onde é evidente a formação de pequenos e novos vasos, para todos os grupos estudados.

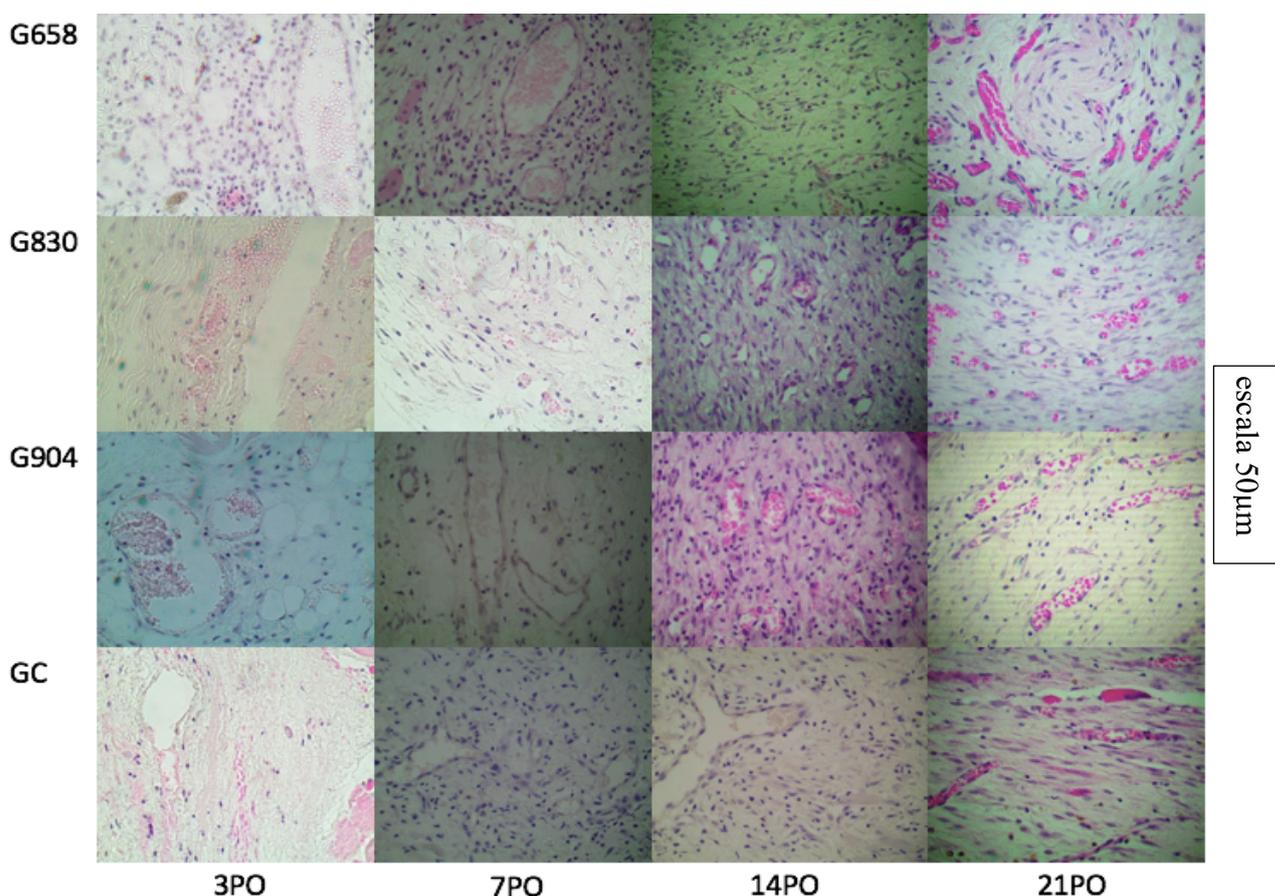


Figura 13 - Resultados da microscopia dos tecidos lesionados corados com H&E

Fonte: Do autor.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.
 G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.
 G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC:
 Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura.
 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura. 21PO:
 vigésimo primeiro dia após queimadura.

5.4 Temperatura cutânea superficial

A temperatura cutânea superficial dos animais submetidos a queimadura de 3º grau foi avaliada antes da aleatorização dos animais e do procedimento de queimadura, seguindo os métodos já apresentados. Antes da queimadura, a média geral de temperatura foi de 31,9°C, com desvio-padrão de 0,57°C. na análise estatística, os grupos G658, G830, G904 e GC apresentaram aumento significativo da temperatura avaliada antes do procedimento de queimadura, nos diferentes dias de análise da temperatura. A Tabela 1 apresenta os valores e as diferenças significativas, após teste T, em relação a temperatura avaliada antes do procedimento de queimadura.

Tabela 1 - Temperatura cutânea superficial antes do procedimento de queimadura comparada com os diferentes dias de análise, nos grupos estudados. Alfenas/MG, 2019.

Grupo	T° antes	Dias de análise	T° dias de análise	p valor	IC95%
G658	31,9 ± 0,5	3PO	35,9 ± 0,5	0,001*	5,5 – 2,4
		7PO	34,8 ± 0,7	0,03*	5,3 – 0,3
		14PO	33,9 ± 1,4	0,85	-2,8 – 3,4
		21PO	34,9 ± 0,6	0,002*	5,1 – 1,7
G830	31,9 ± 0,5		35,6 ± 0,3	0,002*	5,4 – 1,9
		3PO			
		7PO	34,9 ± 0,8	0,01*	5,0 – 0,8
		14PO	34,5 ± 0,9	0,002*	3,9 – 1,2
G904	31,9 ± 0,5		35,4 ± 1,0	0,01*	6,0 – 0,8
		3PO			
		7PO	34,3 ± 0,4	0,001*	3,3 – 1,4
		14PO	34,2 ± 0,7	0,01*	3,9 – 0,5
GC	31,9 ± 0,5		35,3 ± 1,4	<0,0001*	5,5 – 2,9
		3PO			
		7PO	35,7 ± 0,6	<0,0001*	4,9 – 2,5
		14PO	34,8 ± 0,8	0,004*	4,5 – 1,2
		21PO	35,3 ± 1,3	0,01*	4,2 – 0,5

Fonte: Do autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.

G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.

G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm.

GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após

queimadura. 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após

queimadura. 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura. IC95%: Intervalo de confiança de 95%.

*Diferença significativa: Teste T.

O Gráfico 1 mostra as alterações na temperatura cutânea superficial entre os grupos nos 3PO, 7PO, 14PO e 21PO de análise após a queimadura de terceiro grau. É possível notar que, intragrupos, o G904 apresentou aumento significativo da temperatura cutâneo do 7PO para o 21PO ($p=0,01$; $IC95\% = 1,6 - 0,2$). No GC, houve redução

significante do 3PO para o 14 PO ($p=0,01$; IC95% = 0,3 – 2,3), seguido de aumento significativo da temperatura do 3PO para o 21PO ($p=0,03$; IC95% = 0,1 – 3,5).

Ao analisar os tempos intergrupos, nota-se diferença estatística no 7PO ($p=0,01$), sendo observado, após teste de Bonferroni, o GC com maior temperatura cutânea em relação ao G904 ($p=0,02$; IC95% = 0,1 – 2,6). Ainda o GC apresentou maior temperatura cutânea comparado ao G658 e G830, apesar não haver diferenças significantes.

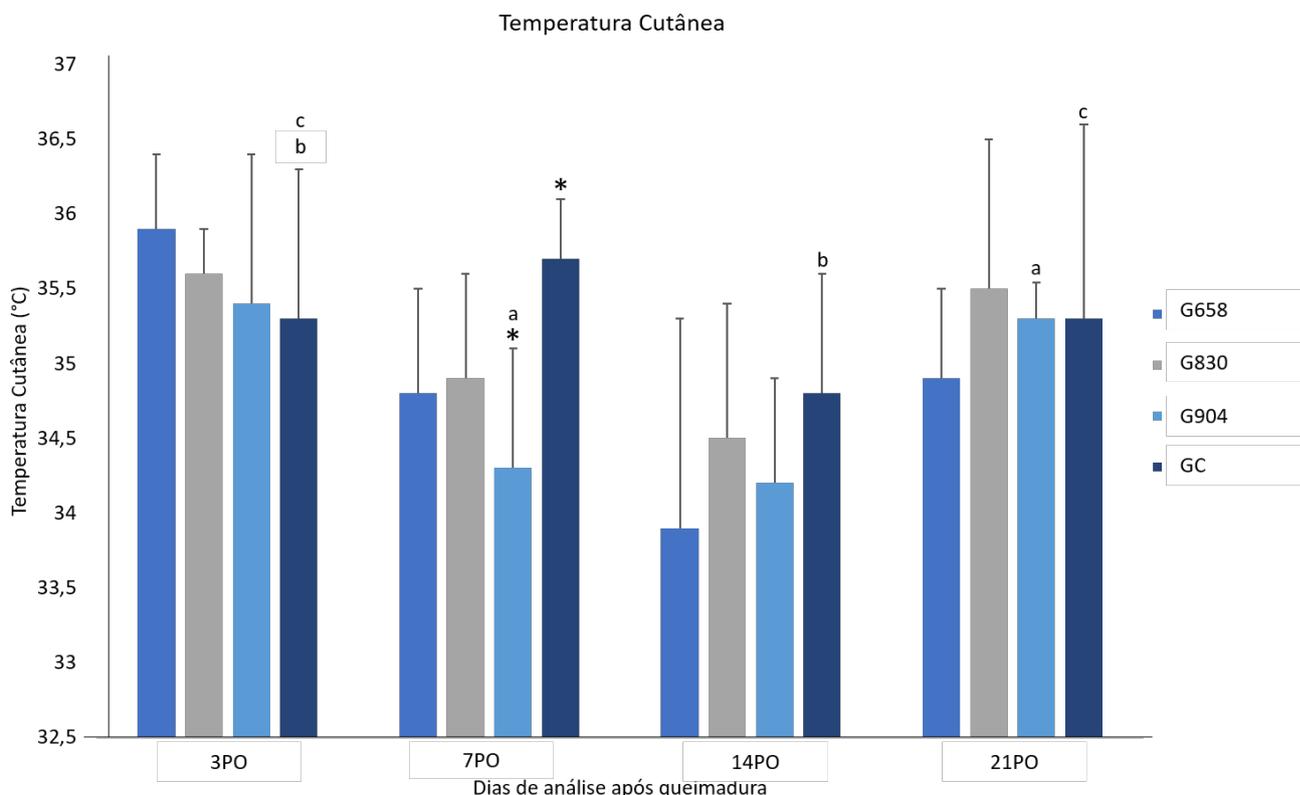


Gráfico 4 - Resultados do número de intersecções encontradas na análise dos vasos sanguíneos nos terceiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após queimadura de terceiro grau em animais, nos grupos estudados.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm.
 G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm.
 G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura. 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura. 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.

^{a, b, c} Análise intragrupos: $p<0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

*Análise intergrupos: $p<0,05$; ANOVA com teste de Bonferroni.

A Figura 14 apresenta as imagens termográficas dos grupos estudados nos diferentes tempos de análise dos dados. As áreas claras correspondem a maior temperatura tecidual.

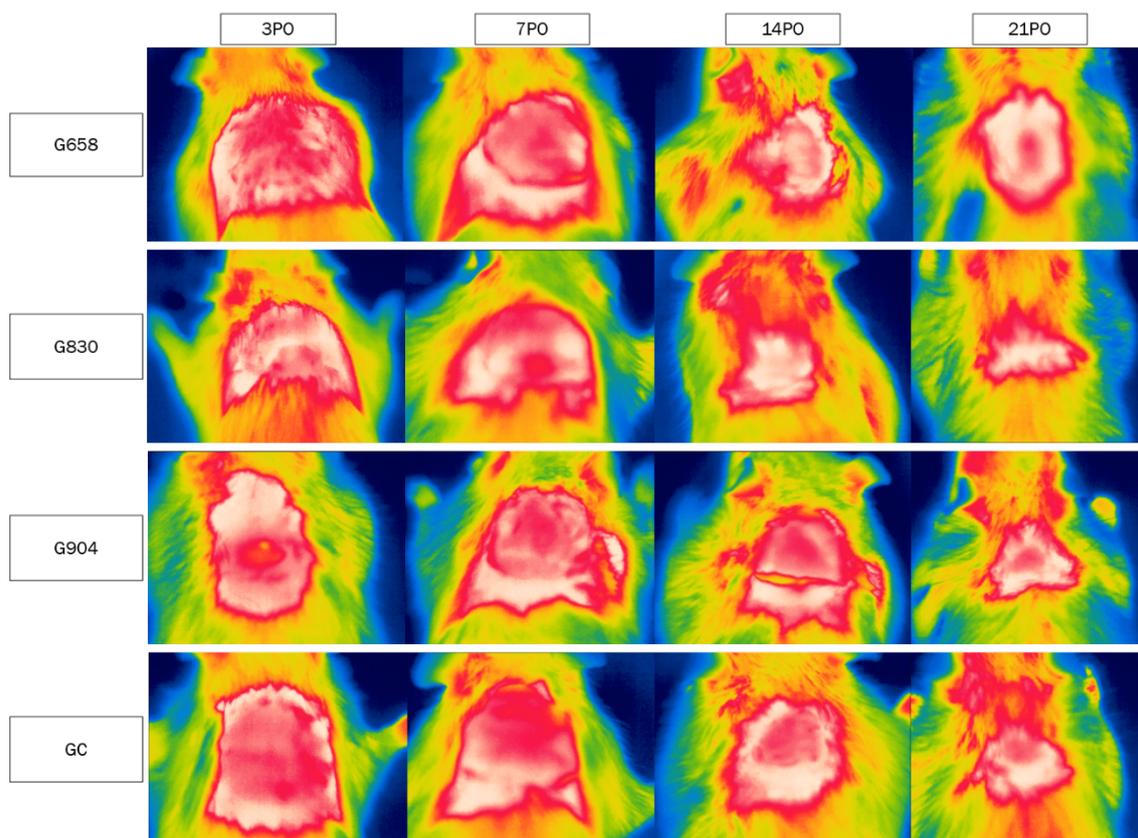


Figura 14 - Fotos termográficas dos diferentes tempos de coleta de dados nos grupos estudados.

Fonte: Do autor.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. 3PO: terceiro dia após queimadura. 7PO: sétimo dia após queimadura. 14PO: décimo quarto dia após queimadura. 21PO: vigésimo primeiro dia após queimadura.

5.5 Correlações

As tabelas 2, 3, 4 e 5 apresentam as correlações encontradas nos diferentes dias de análise após a queimadura, respectivamente, 3PO, 7PO, 14PO e 21PO, nos grupos estudados. São apresentados apenas os dados que apresentaram correlação moderada a muito forte e um valor de $p < 0,05$.

Tabela 2 - Correlação entre as variáveis de estudos no 3º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados. Alfenas/MG, 2019

3º dia de análise após queimadura			
Grupos	Variáveis	Pearson (r)	p valor
G658	Colágeno x Vasos Sanguíneos	1,0	<0,0001
G830	Colágeno x Células inflamatórias	0,76	0,004
	Colágeno x Vasos sanguíneos	1,0	<0,0001
	Vasos sanguíneos x Células inflamatórias	0,76	0,004
G904	Colágeno x Vasos Sanguíneos	1,0	<0,0001
GC	Células inflamatórias x Temperatura Cutânea	0,77	0,003
	Colágeno x Vasos sanguíneos	1,0	<0,0001

Fonte: Do Autor.

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. Pearson (r): 0.9 a 1,0 = correlação muito forte; 0.7 a 0.9 = correlação forte; 0.5 a 0.7 = correlação moderada; 0.3 a 0.5 = correlação fraca; 0 a 0.3 = correlação desprezível.

Tabela 3 - Correlação entre as variáveis de estudos no 7º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados. Alfenas/MG, 2019

7º dia de análise após queimadura			
Grupos	Variáveis	Pearson (r)	p valor
G830	Colágeno x Temperatura cutânea	-0,61	0,03
G904	Colágeno x Vasos Sanguíneos	1,0	<0,0001
GC	Colágeno x Vasos sanguíneos	1,0	<0,0001

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. Pearson (r): 0.9 a 1,0 = correlação muito forte; 0.7 a 0.9 = correlação forte; 0.5 a 0.7 = correlação moderada; 0.3 a 0.5 = correlação fraca; 0 a 0.3 = correlação desprezível.

Tabela 4 - Correlação entre as variáveis de estudos no 14º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados. Alfenas/MG, 2019

14º dia de análise após queimadura			
Grupos	Variáveis	Pearson (r)	p valor
G658	Colágeno x Vasos Sanguíneos	0,72	0,008
	Temperatura cutânea x Células inflamatórias	0,71	0,009
G904	Colágeno x Vasos Sanguíneos	0,95	<0,0001
	Colágeno x Temperatura cutânea	-0,68	0,01
	Temperatura cutânea x Células inflamatórias	0,67	0,01
GC	Células inflamatórias x Vasos Sanguíneos	0,60	0,03
	Colágeno x Vasos sanguíneos	0,94	<0,0001

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. Pearson (r): 0.9 a 1,0 = correlação muito forte; 0.7 a 0.9 = correlação forte; 0.5 a 0.7 = correlação moderada; 0.3 a 0.5 = correlação fraca; 0 a 0.3 = correlação desprezível.

Tabela 5 - Correlação entre as variáveis de estudos no 21º dia de análise após queimadura de 3º grau, nos grupos estudados. Alfenas/MG, 2019

21º dia de análise após queimadura			
Grupos	Variáveis	Pearson (r)	p valor
G658	Vasos Sanguíneos x Temperatura Cutânea	-0,97	<0,0001
	Células inflamatórias x Temperatura Cutânea	-0,59	0,04
	Vasos Sanguíneos x Células inflamatórias	0,65	0,02
G830	Vasos Sanguíneos x Temperatura Cutânea	0,76	0,02
	Colágeno x Vasos sanguíneos	0,92	<0,0001
G904	Colágeno x Vasos Sanguíneos	1,0	<0,0001
GC	Células inflamatórias x Temperatura Cutânea	-0,77	0,003
	Células inflamatórias x Vasos sanguíneos	0,69	0,01
	Colágeno x Vasos sanguíneos	0,92	<0,0001
	Colágeno x Temperatura Cutânea	-0,89	<0,0001
	Vasos sanguíneos x Temperatura Cutânea	-0,98	<0,0001

Fonte: Do Autor

Legenda: G658: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 658nm. G830: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 830nm. G904: Grupo recebeu fotobiomodulação com comprimento de onda de 904nm. GC: Grupo recebeu fotobiomodulação simulada. Pearson (r): 0.9 a 1,0 = correlação muito forte; 0.7 a 0.9 = correlação forte; 0.5 a 0.7 = correlação moderada; 0.3 a 0.5 = correlação fraca; 0 a 0.3 = correlação desprezível.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou os diferentes comprimentos de onda da FBM (658nm, 830nm e 904nm), comparado à FBM simulada, na reparação cutânea em modelo animal,

após queimadura de 3º grau. Os resultados mostraram alterações significativas entre os grupos quando analisadas as células inflamatórias, colágeno tipo III, vasos sanguíneos e temperatura cutânea superficial.

Os grupos que receberam FBM nesse estudo apresentaram resultados satisfatórios comparado com o grupo controle, sendo necessário ressaltar que a luz infravermelha parece ser adequada para o processo de reepitelização, porém ainda são escassos na literatura estudos que envolvam cicatrização de queimaduras e laser de baixa potencia com comprimento de onda mais altos, como o 904nm e 830nm. Rizzi et al. (2018) demonstrou em seu estudo in vitro que o comprimento de onda mais alto (980nm) pode ser responsável por aumentar a produção de Oxido Nítrico, um importante componente químico no processo de cicatrização tecidual, esse estudo sugere uma possível explicação para a efetividade do laser infravermelho, e aponta uma direção que deve ser melhor explorado pela literatura.

A literatura científica apresenta resultados positivos da FBM em queimaduras de terceiro grau, em modelo animal. No entanto, sua maior publicação refere-se, principalmente, a estudos que utilizam o comprimento de onda na faixa espectral de luz vermelha e modo contínuo de aplicação. Os estudos idealizados por Freitas et al. (2013), Nunez et al. (2013), Chiarotto et al. (2014), Catão et al. (2015), Catarino (2015), Brassolatti et al. (2016), Rathnakar et al. (2016) e Silveira et al. (2016) utilizaram, em modelo animal após queimadura, a luz vermelha e obtiveram resultados positivos na melhora da microcirculação e deposição de colágeno, assim como o presente estudo.

Em literatura mais recente, apenas os estudos de Gupta et al. (2015), Yadav et al. (2016), Rathnakar et al. (2016) e Silveira et al. (2016) utilizaram o comprimento de onda de 904nm, infravermelho e modo pulsado, e também encontraram resultados positivos no processo de reparação tecidual. O comprimento de onda de 830nm, utilizado por Rathnakar et al (2016), também apresentou resultados positivos na cicatrização de lesões de queimadura em animais. De acordo com a literatura, nenhum estudo que compare os três diferentes comprimentos de onda, como apresentado na presente pesquisa foi encontrado até o momento. Isto dificulta a análise comparativa entre os achados desta pesquisa e a literatura sobre o tema abordado.

De acordo com o proposto metodológico, foi utilizado uma fluência padronizada para os grupos que receberam fotobiomodulação ($4\text{J}/\text{cm}^2$) considerada ideal para reparos cutâneos pela literatura (MEDRADO et al., 2003; MESTER, 2013) em diferentes comprimentos de ondas, vermelho e infravermelho, (658nm,830nm,904nm) e analisados

em diferentes tempo do reparo tecidual. Medrado et al. (2003) analisou FBM em seu experimento e utilizou duas fluências, $8\text{J}/\text{cm}^2$ e $4\text{J}/\text{cm}^2$, após induzir a lesão no dorso de 72 ratos, os resultados morfológicos e histológicos comprovaram a eficiência no que diz respeito a diminuição da inflamação e aumento de fibras colágenas com o resultados melhores para fluências mais baixas.

De forma geral, os resultados da presente pesquisa mostraram uma superioridade do comprimento de onda de 658nm sobre os demais grupos. Sabe-se que a terapia por FBM produz efeitos quando absorvido pelo tecido, e esta energia luminosa é convertida em energia térmica e bioquímica. Quanto maior o comprimento da onda emitido, maior a profundidade gama, o que resulta em menos absorção dos tecidos superficiais, essa explicação poderia ser um ponto importante para entender o resultado satisfatório do grupo de FBM de 658nm neste trabalho. Além disso, a luz vermelha é ligeiramente absorvida pela hemoglobina e pela água, permitindo uma maior absorção tecidual. Comprimentos de onda mais curtos têm uma ação mais superficial, porque eles são mais absorvidos por esses tecidos (TARTARUNAS et al. 1998; KOLARI, 1985, AVCI et al., 2013).

A quantificação de células inflamatórias obteve resultados satisfatórios nos grupos que receberam FBM com comprimento de onda 658nm e 904nm, sendo que o grupo que recebeu 658nm apresentou uma diminuição na quantidade de células inflamatórias entre o terceiro e o 21º dia após a queimadura. O grupo de FBM de 904nm também reduziu o número de células inflamatórias no período do sétimo para 21º dia após a queimadura.

Fiório et al. (2013) sugere que a FBM resulta em uma taxa mais alta de reparo tecidual. Utilizando as fluências de 3 e $4\text{J}/\text{cm}^2$, próximas a fluência utilizada neste estudo, o estudo citado teve como objetivo investigar a regeneração tecidual após queimaduras de 3º grau, também em modelo animal. Com aplicação da FBM de comprimento de onda de 660nm, observou-se que, ambas as fluências resultaram em menor quantidade de células inflamatórias nos períodos analisados, 8 e 16 dias após a lesão. Estes resultados concordam com os apresentados na presente pesquisa, visto que o grupo que utilizou FBM de 658nm apresentou redução do número de células inflamatórias comparado ao grupo controle nas avaliações realizadas em sétimo e décimo quarto dia pós-operatório, sendo essa redução significativa em vigésimo primeiro dia.

Ao utilizar o comprimento de onda de 660nm e parâmetros de estímulo da FBM semelhantes ao deste estudo, Medeiros et al. (2017) observaram significativo aumento das células inflamatórias sete dias após lesão cutânea em animais que receberam a FBM,

comparado ao grupo controle e, quatorze dias após a lesão, uma redução significativa de células inflamatórias do grupo de FBM comparado ao controle. Dados que corroboram com os achados da presente pesquisa.

Vale destacar que, de acordo com o processo de reparação tecidual, a fase inflamatória apresenta um período descrito de três dias, com diminuição das células inflamatórias (CAMPOS et al., 2007; WITTE et al., 1997). Os resultados dos estudos sugerem um atraso do início do processo inflamatório nos grupos controle e de aplicação de FBM de 904nm.

Corroborando também com os achados da presente pesquisa, outro estudo, descrito por Rabelo (2006), sobre os efeitos da FBM no processo de reparo tecidual em ratos diabéticos e saudáveis, utilizou parâmetros diferentes do estudado nesta pesquisa, 15 mW, tempo de exposição de 17 segundos e densidade de energia de 10 J/cm². porém com o comprimento de onda semelhante (632nm), no espectro de luz vermelha. Os resultados evidenciam que os animais tratados tiveram um processo inflamatório menos intenso que os controles. Os achados no 7º dia, indicam um tecido cicatricial na derme com menos capilares e células inflamatórias mais discretas em relação ao grupo não tratado, especialmente em animais não diabéticos, resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Segundo Dantas et al. (2011), a terapia laser pode facilitar a cicatrização tecidual devido seus efeitos inibitórios no surgimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, interferindo assim nos efeitos de mediadores químicos induzidos pela inflamação. Para Lamaro-Carsoso et al. (2019), a FBM pode promover um processo inflamatório precoce com o comprimento de onda de 660nm. Nossos achados estão de acordo com o que está descrito na literatura, sugerindo que o comprimento de onda 658nm parece interferir na fase inflamatória de maneira mais satisfatória que os demais comprimentos de onda analisados.

Ainda, o comprimento de onda 904nm apresentou redução de células inflamatórias no terceiro dia após queimadura e aumento em sétimo, precisando ser melhor investigado pois não foi encontrado na literatura, até o momento, descrição do seus efeitos anti-inflamatórios em relação ao reparo de tecidos cutâneos pós lesão. De acordo com Tarajad et al. (2013), o comprimento de onda produz diferentes efeitos no fechamento de feridas crônicas, com redução da área de lesão em sujeitos que utilizaram a FBM de 658nm comparado a 830nm e 904nm.

A FBM é capaz de fotoativar mecanismos celulares responsáveis por tratar a área lesionada, acelerando o reparo tecidual. Os citocromos mitocondriais absorvem a radiação da luz e se transformam em energia celular, resultando em uma maior síntese de proteína benéfica para o fechamento da lesão (AVCI et al., 2013; CHUNG et al., 2012). Observou-se neste estudo que, a FBM de 658nm, permitiu um maior número das fibras colágenas tipo III nos dias três e sete após a lesão, sugerindo reparação precoce, quando comparado aos demais grupos. Em 14º e 21º dias após a queimadura o número de colágeno tipo III reduziu em todos os grupos, provavelmente relacionado a substituição pelo colágeno tipo I (BROUGHTON et al., 2006; CAMPOS et al., 2007).

O estudo de Fiório et al. (2013) analisou a quantidade de fibras colágenas do tipo I e tipo III, e seus resultados estão de acordo com que foi encontrado neste trabalho, independente das fluências testadas pelos autores (3 e 4 J/cm²), ambos os grupos que receberam a FBM de 660nm tiveram aumento no número de fibras colágenas em relação ao grupo lesionado e não tratado, principalmente no oitavo dia pós lesão. Já no décimo sexto dia parecem ter se equilibrado, porém os autores foram capazes de identificar um aumento de fibras maduras (tipo I) nos grupos de FBM em comparação ao controle.

Em outro estudo, Fiório et al., (2017), ao analisar animais idosos, notou que a FBM de 660nm, com energia total de 2J por ponto, obteve aumento na produção de colágeno em sétimo dia após a queimadura, com redução no 14º dia, resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa, também sugerindo a substituição pelo colágeno tipo I. Estes autores observaram também aumento da metaloproteinase em 3PO, enzima que atua na degradação de componentes extracelulares e estimula a síntese do colágeno tipo III.

Essa diferenciação entre as fibras colágenas pode servir como uma limitação em nosso estudo, pois foi feita a quantificação apenas do colágeno imaturo do tipo III na área lesionada e tal fato impede uma discussão mais ampla sobre a deposição de colágeno maduro. Todavia, Lamaro-Cardoso et al. (2019) apontam uma maior quantificação de colágeno tipo I, trinta dias após a lesão por queimadura em animais, momento não analisado na presente pesquisa.

Ao analisar as correlações entre as variáveis, nota-se que, em terceiro dia após a queimadura todos os grupos apresentaram correlações forte e muito forte entre colágeno e vasos sanguíneos, sugerindo que a formação de novos vasos favoreça a produção de colágeno imaturo.

Outra variável analisada, a quantificação de vasos sanguíneos, mesmo sem apresentar diferenças estatísticas, reforçam a possibilidade dos grupos que receberam

FBM apresentarem uma maior neovascularização na área lesionada, principalmente nos grupos que receberam FBM de 658nm e 830nm, com maior número de vasos no terceiro dia após queimadura, seguido de uma diminuição no sétimo, 14º e ao 21º dias a quantidade de vasos sanguíneos aparece aumentada quando comparada ao terceiro dia após queimadura. Na figura relacionada aos vasos sanguíneos, observa-se que, em terceiro dia após queimadura há maior número de intersecções relacionada ao maior diâmetro dos vasos devido a vasodilatação fisiológica do processo inflamatório, enquanto no 21º dia, tal número de intersecções voltou a aumentar pelo maior número de vasos, possivelmente secundário a angiogênese.

Fortuna et al. (2017) utilizou em seu estudo o comprimento de onda 670nm ($4\text{J}/\text{cm}^2$) versus o grupo controle, afim de investigar a neoangiogênese e fibroplasia durante o remodelamento tecidual em ratos. Após serem submetidos a uma ferida cirúrgica, os tecidos também foram coletados nos devidos tempos programados, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós lesão. Os autores verificaram resultados positivos no grupo que recebeu FBM nas análises de colágeno e formação de novos vasos, principalmente no décimo quarto dia após a lesão cirúrgica. Embora sem significância estatística, o marcador endotelial VEGF também apresentou aumento no grupo que recebeu FBM de 660nm. Tais resultados fortalecem a possibilidade do comprimento de onda 658nm ser eficiente no processo de neovascularização.

Outro estudo que apresentou melhores resultados na neoangiogênese (GARCIA et al., 2010), utilizou a FBM com fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e comprimento de onda 685nm, os pesquisadores analisaram a efetividade da FBM isolada e associada a outras terapias, além do grupo controle, que não recebeu intervenção. Este trabalho também experimental, onde os autores induziram queimadura de terceiro grau em 96 ratos teve como conclusão que o grupo que recebeu FBM isolado poderia ser útil para tratar queimaduras cutâneas quando iniciadas em um estágio inicial, em específico, a formação de novos vasos foi descrita pelos autores como moderada em torno do sétimo dia após a lesão (GARCIA et al., 2010). Contrapondo o resultado desta pesquisa que, no sétimo dia após a lesão, apresentou queda na quantidade de número de vasos, porém na análise intergrupos, no mesmo período, o grupo que recebeu FBM de 658nm ainda teve valores superior de vasos quando comparado ao controle.

Ao analisar os vasos sanguíneos intergrupos, no sétimo dia após a queimadura, observou-se maior número de vasos no grupo que recebeu FBM de 658nm em relação ao grupo controle. Já no 21º dia o grupo de FBM 658nm aumentou a quantidade de vasos

sanguíneos em comparação com os grupos 904nm e controle. Este resultado talvez indique a superioridade da FBM no espectro de luz vermelha em comparação ao infravermelho em relação a neoangiogênese.

De acordo com Brioschi et al. 2003 a termografia cutânea por imagem infravermelha reflete a dinâmica microcirculatória da superfície em tempo real e pode servir como método diagnóstico para variadas condições de saúde. Não foi encontrado na literatura, até o momento, estudos que abordassem a temperatura cutânea superficial em animais em processo de reparação cutânea após lesões por queimadura de 3º grau, que contribua com a discussão dos resultados obtidos.

Nos resultados que se referem a temperatura cutânea superficial foi notado um comportamento comum entre os grupos que receberam FBM, uma diminuição da temperatura do terceiro para o 14º dia, refletindo a fase de proliferação celular e possível redução do processo inflamatório. Porém, estes grupos apresentaram um aumento de temperatura do 14º para o 21º dia, observando que o grupo de 658nm manteve temperatura mais baixa em relação aos demais grupos.

A escassez de pesquisas em queimaduras que utilizam a termografia como recurso de avaliação dificulta a compreensão do aumento de temperatura (não significativo) que ocorreu em 21º dia após a queimadura. Em análise de artigos sobre reparação tecidual, após quinze dias do processo de cicatrização, há elevação de actina do músculo liso presente na estrutura citoesquelética do miofibroblasto, que, próximo a quatro semanas, sofre apoptose. Este evento leva a hipótese que a contração da ferida é resultado do movimento das células com uma reorganização concomitante do citoesqueleto dos miofibroblastos (CAMPOS et al., 2007; WITTE et al., 1997), que poderia gerar elevação da temperatura.

É necessário destacar que, nas análises de correlação do 21º dia, no grupo de FBM de 658nm, há uma correlação inversa entre a temperatura cutânea e os vasos sanguíneos e as células inflamatórias, inferindo que não há a instalação de um processo inflamatório envolvendo o aumento de temperatura cutânea. Em contrapartida, a correlação é positiva e forte nos grupos que receberam 830nm e 904nm, entre a temperatura e o colágeno, o que poderia incitar que, os fenômenos que ocorrem para a substituição do colágeno contribuiriam para o aumento da temperatura.

Sobre a temperatura cutânea, nota-se ainda que, no grupo controle, a temperatura se elevou do terceiro para o sétimo dia, sugerindo um prolongamento do período inflamatório da reparação tecidual, contradizendo a literatura que apresenta um pico do

processo inflamatório entre o terceiro e quarto dia após a lesão tecidual (CAMPOS et al., 2007; WITTE et al., 1997). Dessa maneira, a redução dessa temperatura nos grupos que receberam a FBM pode sugerir que o processo inflamatório destes grupos foi controlada de maneira efetiva, como demonstrado na pesquisa de Lamaro-Cardoso (2019) ao avaliar a FBM no processo de reparo tecidual de animais sob queimadura cutânea.

Apesar da grande publicação em torno da FBM no reparo tecidual, Brassolatti et al. (2017), em revisão sistemática sobre uso da FBM em queimaduras de modelo animal, destaca a abrangência de parâmetros utilizados e diversidade de protocolos de lesão. Mas, observam que a melhora da microcirculação local e a proliferação celular são os principais benefícios da técnica, como visto neste estudo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos diferentes comprimentos de onda nos diferentes tempos do reparo tecidual pós queimadura de terceiro grau. Ao analisar as variáveis discutidas acima, a FBM com o comprimento de onda 658nm parece favorecer a regeneração tecidual, seguido dos demais comprimentos de ondas quando comparado ao controle.

Diante do exposto, seria necessário análises mais complexas como as realizadas em outros estudos (BRASSOLATI et al. 2017; CHIAROTTO et al. 2014), que estudaram o comportamento de citocinas e fatores de crescimento fundamentais para o reparo tecidual e são importantes sinalizadoras sobre a relação da neoangiogênese e também fibras colágenas que poderiam fortalecer e fundamentar melhor os resultados deste estudo.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo avaliou os efeitos de diferentes comprimentos de onda da FBM nos diferentes tempos do reparo tecidual em queimadura de terceiro grau. A FBM de comprimento de onda 658nm obteve melhores respostas quando comparado aos demais grupos, porém os demais grupos com comprimentos de ondas maiores também se mostraram satisfatórios quando comparado ao controle. Este trabalho fortaleceu o embasamento científico para o uso da FBM no processo de cicatrização tecidual e expos a necessidade de pesquisar os efeitos de comprimentos maiores com critérios de análises rebuscados para entender melhor sua efetividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERS, Juanita J.; LANZAFAME, Raymond J.; ARANY, Praveen R. Low-Level Light/Laser Therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015.
- ANDRADE, Alexsandra G. de; LIMA, Cláudia F. de; ALBUQUERQUE, Ana Karlla B. de. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21–30, 2010.
- ANDRADE, Ana Laura Martins de; PARISI, Julia Risso; BRASSOLATTI, Patrícia; *et al.* Alternative animal model for studies of total skin thickness burns. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 836–842, 2017.
- ANDRADE, C; CORDOVIL, R; BARREIROS, J. Control and safety promotion injuries in preschool children : the hypothetical protector effect of minor injuries and risk factors for minor and medically attended injuries. **International Journal of Injury Control and Safety Promotion**, v. 20, p. 239–241, 2013.
- AVCI, Pinar; GUPTA, Asheesh; SADASIVAM, Magesh; *et al.* Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 32, n. 1, p. 41–52, 2013.
- BAYAT, Mohammad; VASHEGHANI, Mohammad Mehdi; RAZAVIE, Naser; *et al.* Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation. **The Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 45, n. 6, p. 931–938, 2009.
- BOSSINI, Paulo Sérgio; FANGEL, Renan; HABENSCHUS, Rafael Malfará *et al.* Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 209–213, 2009.
- BRASSOLATTI, P. *et al.* Comparative effects of two diferente doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and Technique**, v.79, n.4, p.313–320, 2016.
- BRASSOLATTI, Patricia; LAURA, Ana; ANDRADE, Martins DE *et al.* Evaluation of the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model : a systematic review. **Lasers in Medical Science**, p. 1159–1169, 2018.
- BRIOSCHI, Marcos Leal; MACEDO, Jose Fernando; MACEDO, Rodrigo Almeida Coelho. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 151–60, 2003.
- BROUGHTON G, JANIS JE, ATTINGER CE. Wound healing: na overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117 (7 suppl): 1e-S-32e-S, 2006.
- CAMPOS, A. C. L; BORGES-BRANCO A; GROTH A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

- CAMPOS, Tarcísio F; BECKENKAMP, Paula R; MOSELEY, Anne M. Usage evaluation of a resource to support evidence-based physiotherapy : the Physiotherapy Evidence Database (PEDro). **Physiotherapy**, v. 99, n. 3, p. 252–257, 2013.
- CATÃO, M. H. C. et al. Effects of red laser, infrared, photodynamic therapy, and green LED on the healing process of third-degree burns: clinical and histological study in rats. **Lasers in Medical Science**, v.30, n.1, p. 421–428, 2015.
- CATARINO, H. R. C. *et al.* InGaP 670-nm laser therapy combined with a hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen in burn injuries. **Lasers in Medical Science**, v.30, n.3, p.1069–1079, 2015.
- CHAMUSCA, Flávia Vilela; REIS, Sílvia Regina Almeida; LEMAIRE, Denise *et al.* Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 1, p. 70, 2018.
- CHIAROTTO, G. B et al. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. **Lasers in Medical Science**, v.29, n.5, p.685–1693, 2014.
- CHUNG, Hoon; TIANHONG, Dai; SULBHA K, Sharma *et al.* The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy Hoon. **Ann Biomed Eng**, v. 21, n. 2, p. 240–248, 2012.
- DE ARAÚJO, Carlos E N; RIBEIRO, Martha S; FAVARO, Rodolfo *et al.* Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 2, p. 87–96, 2007.
- DE MELO RAMBO, Caroline Sobral; LIGEIRO, Ana Paula; SILVA, Jose Antônio *et al.* Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 5, p. 1723–1733, 2014.
- DESMET, Kristina D.; HENRY, Michele M; LIANG, Huan Ling *et al.* Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 121–128, 2006.
- DETMAR, Michael; CLAFFEY, Kevin P; BERSE, Brygida *et al.* Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (vpf/vegf) and its receptors in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 3, p. 263–268, 2004.
- EVERS, Lars H; BHAVSAR, Dhaval; MAILÄNDER, Peter. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777–783, 2010.

EZZATI, Ali; BAYAT, Mohammad; TAHERI, Sodabe *et al.* Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. **The Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 46, n. 4, p. 543, 2009.

FIÓRIO, Franciane B; ALBERTINI, Regiane; LEAL JUNIOR, Ernesto Cesar Pinto *et al.* Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 313–319, 2014.

FORTUNA, Tila; CRISTINA, Ana; MAÍRA, Gonzalez *et al.* **Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair.** [S.l.] : Medicalhelplines.com Inc and John Wiley, 2017. p. 1–9.

GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P. P. *et al.* Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, p. 81–89, 2003.

GARCIA, Valdir Gouveia; LIMA, Marcos Alcântara de; OKAMOTO, Tetuo *et al.* Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn : histological study in rats. **Lasers in Medical Science**, p. 221–228, 2010.

GILLITZER, Reinhard; GOEBELER, Matthias. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, 2001.

GUPTA, A. *et al.* Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. **Journal Biophotonics**, v. 8, n. 6, p. 489–501, 2015.

JÄRBRINK, Krister *et al.* Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: A protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2016.

JOHNSON, Kelly E; WILGUS, Traci A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. **JOHNSON AND WILGUS**, v. 3, n. 10, p. 647–661, 2014.

JOHNSON, R. Michael; RICHARD, Reg. Partial-Thickness Burns: Identification and Management. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 16, n. 4, p. 178–187, 2003.

KEVIN, Zuo J.; MEDINA, Abelardo; TREDGET, Edward E. Important developments in burn care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 139, n. 1, p. 120e–138e, 2017.

KOLARI, P. J. Penetration of unfocused laser light into the skin. **Archives of Dermatological Research**, p. 342–344, 1985.

LAMARO-CARDOSO, Alexandre; BACHION, Maria M; MORAIS, Júlia M *et al.* PT Corresponding author. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 2019.

LAU, Pik Suan; BIDIN, Noriah; KRISHNAN, Ganesan *et al.* Biophotonic effect of diode laser irradiance on tensile strength of diabetic rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy Biophotonic**, 2014.

LEITE, Gabriella de Paula Marcondes Ferreira; DAS NEVES, Lais Mara Siqueira; SILVA, Carlos Alberto *et al.* Photobiomodulation laser and pulsed electrical field increase the viability of the musculocutaneous flap in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 3, p. 641–648, 2017.

LIEBERT, Mary Ann; RABELO, Sylvia Bicalho; VILLAVERDE, Antonio Balbin *et al.* Comparison between Wound Healing in Induced Diabetic and Nondiabetic Rats after Low-Level Laser Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 474–479, 2006.

LINS, Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa; LUCENA, Keila Cristina Raposo; GRANVILLE-GARCIA, Ana Flávia *et al.* Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais Brasileiro Dermatologia** v. 85, n. 6, 2010.

MEDRADO, Alena R.A.P.; PUGLIESE, Livia S.; REIS, Silvia Regina A. *et al.* Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2003.

MEIRELES, Gyselle C.S.; MOURA, Adriana P; SANTOS, Jean N. *et al.* Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 47–54, 2008.

MESTER, Adam. Laser biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, p. 237–239, 2013.

MINATEL, Debora G; FRADE, Marco Andrey C; FRANÇA, Suzelei C. *et al.* Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 6, p. 433–441, 2009.

MOORE, Z.; BUTCHER, G.; CORBETT, L. Q. Exploring the concept of a team approach to wound care: Managing wounds as a team. **Journal of Wound Care**, v. 23, n. Sup5b, p. S1–S38, 2014.

NOVAES, Romulo D.; GONCALVES, Reggiani V.; CUPERTINO, Marli C. *et al.* The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. **International Journal of Experimental Pathology**, p. 138–146, 2014.

NÚÑEZ, S.C. *et al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633–641, 2013.

NÚÑEZ, Silvia Cristina; NOGUEIRA, Gessé Eduardo Calvo; PRATES, Renato Araujo *et al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633–641, 2012.

- OGAWA, Rei. Mechanobiology of scarring. **Wound Repair and Regeneration Mechanobiology**, v. 19, p. S2–S9, 2011.
- PALMIERI, Tina L. Pediatric Burn Resuscitation. **Critical Care Clinics**, 2016.
- PHILLIPS, STEVEN J. Physiology of wound healing and surgical wound care. **ASAIO Journal** 2000, p. 2–5, 2000.
- QUEIROZ, Paulo Roberto; LIMA, Kenio Costa De; ALCÂNTARA, Izabel Calixta De. Prevalência e fatores associados a queimaduras de terceiro grau no município de Natal, RN - Brasil Prevalence and factors associated with third degree burns in the city of Natal, RN- Brazil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 169–176, 2013.
- RATHNAKAR, B. *et al.* Photo-biomodulatory response of low-power laser irradiation on burn tissue repair in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 9, p.1741–1750, 2016.
- REDDY, G. Kesava. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, n. 2, p. 141–150, 2004.
- RIZZI, Manuela; MIGLIARIO, Mario; TONELLO, Stelvio *et al.* Photobiomodulation induces in vitro re-epithelialization via nitric oxide production. **Lasers in Medical Science**, 2018.
- ROBERT, Visse; HIDEAKI, Nagase. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in pulmonary fibrosis. **Circulation Research**, n. 92, p. 827–839, 2003.
- RODRIGO, Simone Marja; CUNHA, Alexandre; POZZA, Daniel Humberto *et al.* analysis of the Systemic Effect of Red and Infrared Laser Therapy on Wound Repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, p. 929–935, 2009.
- SANTOS, Joao Vasco; SOUZA, Julio; AMARANTE, Jose; *et al.* Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014 : A Nationwide Hospital-Based Study. **World Journal Surgery**, 2017.
- SAPIRSTEIN, Adam; BONVENTRE, Joseph V. Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A2 as defined by gene knockouts. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1–2, p. 139–148, 2000.
- SHUKLA, Arti; DUBEY, M P; SRIVASTAVA, Ranjana *et al.* Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, n. 2, p. 434–439, 1998.
- SILVEIRA, P. C. *et al.* Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1395-404, 2016.

- SINGER, Adam J.; CLARK, Richard A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, 1999.
- SOLEIMANI, Hasan; AMINI, Abdollah; TAHERI, Soudabeh *et al.* The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 181, p. 23–30, 2018.
- SORG, Heiko; TILKORN, Daniel J.; HAGER, Stephan *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.
- SOTO-PANTOJA, David R; SHIH, Hubert B; MAXHIMER, Justin B. *et al.* Thrombospondin-1 and CD47 signaling regulate healing of thermal injury in mice. **Matrix Biology**, p. 1–10, 2014.
- SOUSSI, Sabri; BERGER, Mette M; COLPAERT, Kirsten *et al.* Hemodynamic management of critically ill burn patients : an international survey. **Critical Care**, p. 4–6, 2018.
- SOUZA, C. M. C. O.; MESQUITA, L. A. F.; SOUZA, D. *et al.* Regeneration of skin tissue promoted by mesenchymal stem cells seeded in nanostructured membrane. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1882–1886, 2014.
- TARADAJ, J.; HALSKI, T.; KUCHARZEWSKI, M. *et al.* Effect of Laser Irradiation at Different Wavelengths (940 , 808 , and 658 nm) on Pressure Ulcer Healing : Results from a Clinical Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cirúrgica Brasileira**, 1998.
- TIAN, Hao; WANG, Liangxi; XIE, Weiguo *et al.* Epidemiologic and clinical characteristics of severe burn patients : results of a retrospective multicenter study in China , 2011 – 2015. **Burns & Trauma**, 2018.
- WITTE, Maria B; BARBUL, Adrian. General principles of wound healing. **Wound Healing**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.
- XUE, Chuan; FRIEDMAN, Avner; KAO, Chiu-Yen *et al.* Propagation of cutaneous thermal injury: A mathematical model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 1, p. 114–122, 2012.
- YADAV, A. *et al.* Photobiomodulatory effects of superpulsed 904 nm laser therapy on bioenergetics status in burn wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.162, p.77–85, 2016.

ZHAO, Jiajia; HU, Li; GONG, Niya et al. The effects of macrophage-stimulating protein on the migration , proliferation and collagen synthesis of skin fibroblasts in vitro and in vivo. **Tissue Engineering – Part A**, p. 1–38, 2014.

ANEXO I- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da Terapia Laser de Baixa Intensidade (660nm, 839nm e 904nm) em queimaduras de terceiro grau em ratos", registrada com o nº 47/2016, sob a responsabilidade de Ligia de Sousa, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 20/12/2016 a 30/12/2018	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	128	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 20 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador - CEUA-UNIFAL