



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ALEXANDRE LAMARO CARDOSO

Efeitos da ação bioestimulatória do Laser de baixa potência associada à aplicação de fração estromal vascular contendo células-tronco derivadas de tecido adiposo no tratamento de feridas por queimadura em ratos

**Goiânia
2015**

**Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações
Eletrônicas (TDE) na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
(BDTD)**

ALEXANDRE LAMARO CARDOSO

Efeitos da ação bioestimulatória do Laser de baixa potência associada à aplicação de fração estromal vascular contendo células-tronco derivadas de tecido adiposo no tratamento de feridas por queimadura em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Maria Márcia Bachion
Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Goiânia
2015

BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno(a): Alexandre Lamaro Cardoso

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Márcia Bachion

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Membros:

1. Maria Márcia Bachion

2. Nivaldo Antônio Parizotto

3. Leila Maria Leal Parente

OU

4. Maria Helena de Melo Lima

5. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol

Data: 22/05/2015

*Dedico esse trabalho aos meus
amados pais Jorge Luiz Cardoso
e Diva Helena Lamaro Cardoso
por seu carinho, cuidado e pelo incentivo
à busca da verdade pelos caminhos da razão
aliados aos valores do coração.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que vibra na essência de todas as coisas, causa primária de tudo que aí está, por dar origem à existência nos permitindo agora observar extasiados a grandeza de tudo que dele deriva.

À Professora Dra. Maria Márcia Bachion, minha orientadora, pela confiança depositada em meu trabalho e por acreditar nas possibilidades de aprendizado e desenvolvimento associadas a este estudo. Seus exemplos de competência, organização, dinamismo e a busca por produzir ciência capaz de reduzir o sofrimento humano são lições que levarei na mente e no coração por toda minha vida.

Ao professor Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, meu co-orientador, por seus exemplos de dedicação, ética e compromisso com o desenvolvimento de seus estudantes, pela extrema competência e direcionamento nas análises microscópicas e na condução dos procedimentos experimentais, por sua disponibilidade e colaboração no esclarecimento de dúvidas e questionamentos durante a construção deste manuscrito. Muito obrigado pela oportunidade de realizar esse trabalho e por seu constante apoio em todos os momentos.

À professora Dra. Júlia de Miranda Morais, sem a qual este projeto não teria acontecido, seu conhecimento, dedicação e competência são exemplos marcantes para todos que buscam fazer ciência com compromisso e qualidade. Serei eternamente grato pela amizade e por tudo que tive a oportunidade de aprender ao seu lado.

Ao Professor Dr. Andris Figueiroa Bakuzis do Laboratório de Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo, Instituto de Física-UFG, pelo apoio e presteza

com que nos auxiliou na análise de potência do emissor Laser utilizado neste estudo.

À Vera Lúcia L. de Almeida por seu inestimável auxílio em todas as fases da experimentação animal, sua amizade, dedicação e compromisso foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao colega Marcelo Fantinati, por suas orientações na construção e aplicação prática dos protocolos de experimentação animal, seu companheirismo e presteza em nos auxiliar em todos os momentos.

À Vânia Beatriz Lopes pelo excelente trabalho na preparação das lâminas para microscopia, sua amizade, alegria e disponibilidade em nos ajudar.

Aos amigos Suair Campos, Wakylla S. Silva, Ketlyn G. das Neves e Ana Carolina A. da Silva pelo valioso auxílio prestado ao longo da realização dos experimentos e coleta de dados.

Aos colegas do laboratório de Patologia Experimental Hidelberto M. Silva, Sara D. Lima e Diego E. Mendonça por sua companhia, auxílio e incentivo ao longo de todo o tempo que convivemos juntos.

À coordenação e corpo docente do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina e da Universidade Federal de Goiás, meu respeito e admiração, pois certamente contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos funcionários e servidores técnicos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) pela atenção e colaboração prestada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro.

Aos meus amados irmãos Juliana e Leonardo pela oportunidade de estarmos juntos nessa existência.

À todos os animais que tiveram suas vidas sacrificadas em nome do avanço de nosso conhecimento, minha eterna gratidão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu respeito e sincero agradecimento.

1 INTRODUÇÃO	17
2 HIPÓTESE	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 Tipo e local da pesquisa.....	31
4.2 Aspectos éticos e amostragem	31
4.3 Protocolo de lesão.....	31
4.4 Protocolo de coleta e preparação da fração estromal	32
4.5 Protocolo de implantação da fração estromal vascular na ferida experimental...	35
4.6 Delineamento experimental.....	36
4.7 Procedimento de desbridamento da ferida:.....	38
4.8 Procedimento de irradiação Laser:.....	38
4.9 Equipamento para irradiação Laser e definição de parâmetros dosimétricos:	39
4.10 Avaliação macroscópica.....	43
4.11 Avaliação morfométrica.....	43
4.12 Avaliação Microscópica.....	43
4.13 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Avaliação Macroscópica.....	45
5.2 Avaliação microscópica	54
5.3 Avaliação morfométrica	66
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	85

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1 - Média e desvio padrão de potência óptica útil do equipamento Laser utilizado no estudo.....	40
Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos de irradiação Laser nos grupos experimentais L27, L53 e L76.....	42
Tabela 3 - Processos patológicos gerais analisados em diferentes tecidos de ferida de queimadura induzida em ratos.....	44
Tabela 4 - Análise morfométrica do percentual de contração da ferida.....	66
Figura 1 - Deposição de colágeno ao longo das fases de reparo tecidual.....	21
Figura 2 - Extração de tecido adiposo intra-abdominal via dissecação cirúrgica de animal doador.....	32
Figura 3 - Solução de transporte contendo tecido adiposo coletado e conduzido ao fluxo laminar.....	32
Figura 4 - Tecido coletado após lavagem em PBS estéril a 2% e depositado em placa de Petri.....	33
Figura 5 - Tecido adiposo após 50 minutos de digestão em solução de colagenase tipo I.....	33
Figura 6 - Filtração tecidual em filtro de 70 µm após digestão enzimática.....	34
Figura 7 - FEV resuspensa em PBS estéril a 2% após centrifugação.....	35
Figura 8 - Procedimento de injeção subcutânea de FEV em borda de ferida experimental após desbridamento cirúrgico.....	35

Figura 9 - Lesão por queimadura experimental após desbridamento cirúrgico.....	38
Figura 10 - Irradiação Laser por método pontual aplicada no leito da ferida experimental.....	39
Figura 11 - Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 30 mW por um tempo de 60 segundos.....	40
Figura 12 - Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 60 mW por um tempo de 60 segundos.....	41
Figura 13 - Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 100 mW por um tempo de 60 segundos.....	41
Figura 14 - Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocada em ratos no 3º dia após a indução da lesão.....	47
Figura 15 - Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocada em ratos no 7º dia após a indução da lesão.....	50
Figura 16 - Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocada em ratos no 30º dia após a indução.....	53
Figura 17 - Fotomicroscopia em aumento de 5 x no 3º dia após a indução da lesão.....	56
Figura 18 - Fotomicroscopia em aumento de 40 x no 3º dia após a indução da lesão.....	57
Figura 19 - Fotomicroscopia no aumento de 5 x no 7º dia após a indução da lesão.....	60

Figura 20 - Fotomicroscopia no aumento de 40 x no 7º dia após a indução da lesão.....	61
Figura 21 - Fotomicroscopia no aumento 5x no 30º dia após a indução da lesão.....	64
Figura 22 - Fotomicroscopia no aumento 40 x no 30º dia após a indução da lesão.....	65
Quadro 1 - Macroscopia de processos patológicos gerais em queimaduras aos três dias após a indução da lesão.....	46
Quadro 2 - Macroscopia de processos patológicos gerais em queimaduras aos sete dias após a indução da lesão.....	49
Quadro 3 - Macroscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 30 dias após a indução da lesão.....	52
Quadro 4 - Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 3 dias após a indução da lesão.....	55
Quadro 5 - . Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 7 dias após a indução da lesão.....	59
Quadro 6 - Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 30 dias após a indução da lesão.....	63
Anexo - Aprovação no Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UFG.....	85

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

IL-1 α - Interleucina 1 alfa

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β - Fator de crescimento de transformação Beta

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

FGF - Fator de crescimento derivado dos fibroblastos

EGF - Fator de crescimento epidérmico

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FEV - Fração estromal vascular

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

CTDA - Células tronco derivadas de tecido adiposo

CTDM - Células tronco derivadas da medula óssea

KGF - Fator de crescimento do queratinócito

EGF - Fator de crescimento epidermal

LBP - Laser de baixa potência

IEC - *Internacional Electrotechnical Commission*

LEA - Limites de Emissão Acessível

NO - Óxido nítrico

Kir - Canais de K⁺

CEUA - Comitê de Ética no uso de animais

PVC - Policloreto de polivinila

PBS - *Phosphate Buffer Solution*

FEVL27 - Grupo Fração Estromal Vascular associado a L27

FEVL53 - Grupo Fração Estromal Vascular associado a L53

FEVL76 - Fração Estromal Vascular associado a L76

CT - Grupo Controle

DAI - Dia após a indução da lesão

NIH - National Institute of Health

CL - Nível de contração

T⁰ - Dia da indução da lesão

T^{dias de eutanásia} - Dias após a indução da lesão

H&E - Hematoxilina e Eosina

PMN - Polimorfonucleares

MN - Mononucleares

NOS - Óxido nítrico sintetase

MRL - *Murphy Roths Large*

FAK - Kinase de adesão focal

ERK - Kinase regulada por sinal extracelular

IL - Interleucina

bFGF - Fator de crescimento básico do fibroblasto

TGF- α - Fator de crescimento de transformação alfa

COL1 α 1 - Gene do colágeno tipo I alpha 1

APC - Células apresentadoras de antígenos

IFN γ - Intérferon gama

M2 - Macrófagos alternativamente ativados

NK - Células assassinas naturais

MRL - Macrófagos associados ao reparo de lesões

MR - Macrófagos regulatórios

LPS - Lipopolissacarídeos

MAPK - Mitogênico ativado por proteína quinas

NF- κ β - Fator Nuclear KappaB

M1 - Macrófagos classicamente ativados

TIMP-2 - Inibidor tecidual de metaloproteinase 2

RESUMO

Fração estromal vascular e irradiação com Laser de baixa potência são recursos potencialmente aplicáveis no tratamento de lesões por queimadura. O presente estudo teve por **objetivo:** (i) analisar os efeitos macroscópicos, microscópicos e morfométricos da aplicação de fração estromal vascular contendo células-tronco derivadas de tecido adiposo comparada ao cuidado convencional em lesões por queimadura de 3º grau em ratos; (ii) analisar os efeitos macroscópicos, microscópicos e morfométricos da aplicação de fração estromal vascular contendo células-tronco derivadas de tecido adiposo associada ao Laser de baixa potência comparada ao cuidado convencional em lesões por queimadura de 3º grau em ratos; (iii) analisar se os efeitos macroscópicos, microscópicos e morfométricos da aplicação de fração estromal vascular associada ao Laser de baixa potência são dependentes da dose de irradiação aplicada. **Método:** Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da UFG, protocolo número 035/2013. Todos os animais receberam injeções de fração estromal vascular preparada a partir do tecido adiposo extraído de animal doador e curativo oclusivo. Os animais foram distribuídos em 5 grupos: controle (CT), fração estromal vascular (FEV), fração estromal vascular mais Laser a 27mW de potência (FEVL27), fração estromal vascular mais Laser a 53mW de potência (FEVL53) e fração estromal vascular mais Laser a 76mW de potência (FEVL76). Foram acompanhados ao longo dos dias 3, 7 e trinta para a avaliação dos aspectos macroscópicos, microscópicos e morfométricos. Para análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. **Resultados:** a análise morfométrica mostrou redução da área da ferida mais acentuada no grupo FEVL27 comparado ao demais, porém, sem diferença estatisticamente significativa. No grupo FEVL76 foi observada inibição da contração da ferida comparada aos grupos FEVL27 e CT. Foi observado no 3º dia aumento significativo ($p < 0,05$) do infiltrado polimorfonuclear, formação de fibrina e número de fibroblastos em todos os grupos tratados comparados ao CT. No 7º dia o infiltrado mononuclear, angiogênese, colágeno e número de fibroblastos foi significativamente maior em todos os grupos tratados comparados ao CT ($p < 0,05$). O grupo FEVL27 também apresentou maior número de fibroblastos comparado aos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76. Aos 30 dias aumento significativo da reepitalização e deposição de colágeno foram observados em todos os grupos tratados comparados ao CT ($p < 0,05$). O grupo FEVL53 também apresentou maior infiltrado polimorfonuclear comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). **Conclusão:** aplicação isolada de FEV ou em associação com Laser de baixa potência confere melhores resultados que o cuidado convencional em lesões por queimadura em ratos e os efeitos da associação dos dois recursos são dose dependentes.

ABSTRACT

Stromal vascular fraction and irradiation with low level laser are resources potentially applicable in the treatment of burn injuries. **Objectives** This study aimed to: (i) analyze the macroscopic, microscopic and morphometric effects of stromal vascular fraction application compared to conventional care in 3rd degree burn injuries in rats; (ii) analyze the macroscopic, microscopic and morphometric effects of stromal vascular fraction containing adipose derived stem cells application associated with low level laser compared to conventional care in 3rd degree burn injuries in rats; (iii) whether the macroscopic, microscopic and morphometric effects of stromal vascular fraction containing adipose derived stem cells application associated with low level laser irradiation are dependent on the irradiation dose applied. **Method:** This project was approved by the Ethics Committee on the use of animals at UFG, protocol number 035/2013. All animals received injections of stromal vascular fraction prepared from adipose tissue extracted from a animal donor and occlusive dressing. The animals were divided into 5 groups: control (CT), stromal vascular fraction (SVF), stromal vascular fraction plus Laser at 27mW of power (SVFL27), stromal vascular fraction plus Laser at 53mW of power (SVFL53) and stromal vascular fraction plus Laser at 76mW of power (SVFL76). The animals were followed over days 3, 7 and 30 for the evaluation of macroscopic, microscopic and morphometric aspects. For statistical analysis we used the parametric "t test". **Results:** The morphometric analysis showed a reduction in wound area in SVFL27 group compared to the others, but without statistically significant difference. In SVFL76 group was observed inhibition of wound contraction compared to SVFL27 and CT groups ($p < 0,05$). Was observed on day 3 significantly increased ($p < 0.05$) infiltration of polymorphonuclear, fibrin formation and in the number of fibroblasts in all treated groups compared to CT. On the 7th day the mononuclear infiltrate, angiogenesis, collagen and number of fibroblasts was significantly higher in all treated groups compared to CT ($p < 0.05$). The SVFL27 group also showed a higher number of fibroblasts compared to groups SVF, SVFL53 and SVFL76. At 30 days significantly increased reepitalization and collagen deposition were observed in all treated groups compared to CT ($p < 0.05$). The SVFL53 group also showed higher polymorphonuclear infiltrate compared to other groups ($p < 0.05$). **Conclusion:** Isolated application of SFV or in combination with low level Laser gives better results than conventional care in burn injury in rats and the effects of the combination of the two features are dose dependent.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento dos complexos processos envolvidos no reparo tecidual tem avançado significativamente nos últimos anos. Novas perspectivas terapêuticas baseadas na utilização de agentes bioestimulantes, terapia celular e biomateriais vêm sendo estudadas para a promoção de melhores resultados no tratamento de tecidos danificados (CHO et al, 2011).

Feridas por queimaduras são consideradas formas severas de dano tecidual capazes de promover a destruição de diversas estruturas em diferentes profundidades, levando a alterações patológicas em tecidos subcutâneos, fáscias, músculos e ossos. Embora grandes avanços tenham sido feitos no tratamento de indivíduos que sofreram lesões por queimadura, numerosos desafios ainda devem ser superados para que a recuperação se faça da maneira mais funcional possível (MORAIS et al, 2012).

Dependendo da intensidade, característica física e tempo de contato do agente térmico com o tecido cutâneo, a queimadura resultante pode ser classificada em três diferentes graus. O principal critério utilizado neste sistema de classificação é a profundidade da lesão avaliada em termos de destruição das três principais camadas componentes da pele (KEARNS; HOLMES; CAIRNS, 2013).

Queimaduras de primeiro grau envolvem apenas lesão da epiderme e estão associadas à formação de eritema local, sensação de calor e dor moderada. Não há surgimento de bolhas e o reparo tecidual progride de forma rápida e sem sinais de cicatrização aberrante. Quando há destruição completa da epiderme e parcial da derme a lesão é considerada de segundo grau, apresentando dor, eritema, edema, formação de bolhas e ulcerações. O processo de reparo é consideravelmente mais lento podendo levar a deformidades cicatriciais (VALE, 2005)

Destruição de todas as camadas da pele, eventualmente afetando tendões, músculos e ossos, é considerada lesão de terceiro grau. A

destruição das terminações nervosas livres da derme torna essas lesões indolores e procedimentos de enxertia são freqüentemente necessários para otimizar o reparo tecidual que normalmente evolui com formação de cicatrizes hipertróficas, fibrose acentuada e aderência tecidual (WARNER; COFFEE; YOWLER, 2014).

A incidência global de queimaduras requerendo intervenção médica em 2004 foi de aproximadamente 11 milhões de pessoas. Embora a maioria dos casos ao redor do mundo não sejam fatais, lesões por queimaduras estão entre as principais causas de incapacidade em países de baixa e média renda (PECK, 2011).

A Sociedade Brasileira de Queimaduras estima que milhões de casos de queimadura ocorram todos os anos no Brasil. Cerca de 200.000 casos são tratados em salas de emergência e 14.000 requerem hospitalização. Estimativas apresentadas em um estudo conduzido no Distrito Federal do Brasil mostraram uma taxa de mortalidade de 6,2% entre vítimas de queimaduras internadas em salas de emergências. Dentre as causas de morte violenta no Brasil, lesões por queimadura representam a terceira mais importante causa após acidentes automobilísticos e homicídios (VALE, 2005).

O reparo tecidual em lesões por queimadura de terceiro grau é caracterizado por complexos mecanismos fisiológicos locais e sistêmicos. As fases observadas na evolução do processo de reparo, a saber, inflamatória, proliferativa e maturação, são diferenciadas por eventos fundamentais que atuam como pré-requisitos para a continuidade da cicatrização nos períodos seguintes e que se sobrepõem consideravelmente ao longo da evolução temporal da cicatrização (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

Na fase inflamatória, com duração aproximada de cinco dias, ocorre a liberação de interleucina 1 alfa (IL)-1 α e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) de queratinócitos ativados pelo estímulo lesivo, provocando a atração de células vizinhas para o local da agressão. Nas porções terminais de pequenos vasos sanguíneos da derme, mastócitos reagem por meio da degranulação, liberação de histamina pré-armazenada e fatores quimiotáticos (NG, 2010).

Substâncias vasoconstritoras, como o tromboxano A₂ e as prostaglandinas são liberadas pelas membranas de células endoteliais. Visando a hemostasia, o endotélio lesado e as plaquetas iniciam a cascata de coagulação, grânulos são liberados contendo fator de crescimento de transformação Beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), responsáveis pela atração de polimorfonucleares para a ferida. (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A liberação de histamina pelos mastócitos induz a vasodilatação regional e aumento da permeabilidade capilar, permitindo que os polimorfonucleares recrutados alcancem o local da lesão para remoção de *debris* e proteção do tecido contra a invasão de patógenos. Os neutrófilos, principais componentes do infiltrado polimorfonuclear, são as primeiras células a chegar à lesão atingindo seu pico de concentração vinte e quatro horas após o estímulo (DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015).

Gradativamente, os neutrófilos vão sendo substituídos por macrófagos, componentes do infiltrado mononuclear, responsáveis pela continuidade do processo de reparo por meio da secreção de mitógenos e quimiotáticos para fibroblastos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

O aumento da permeabilidade capilar também permite que o exsudato inflamatório rico em proteínas alcance o espaço intersticial formando depósitos de fibrina. Através da fibronectina, ligada à fibrina por integrinas, os fibroblastos podem migrar para a área de lesão (BOO; DAGNINO, 2013).

Durante a inflamação, ocorre acentuada liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) para a destruição de patógenos, fatores pró-inflamatórios que aumentam a adesão e migração celular pelos vasos sanguíneos e de grande repertório de citocinas responsáveis por orquestrar o crescimento e remodelamento do novo tecido que será produzido (MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

Nos últimos dias da fase inflamatória têm início os processos característicos da fase proliferativa, que se prolongam até o final da

segunda semana após a lesão. Quatro eventos característicos definem esta fase: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A epitelização ocorre de forma precoce nos três primeiros dias caso a membrana basal esteja intacta. Células epiteliais migram da derme profunda para a zona de lesão e as camadas da epiderme são rapidamente restauradas. Em caso de lesão da membrana basal, células das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de reconstruir a barreira protetora (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A angiogênese, proliferação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, pode ser induzida por um grande número de fatores de crescimento e citocinas. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é considerado um dos mais potentes agentes angiogênicos conhecidos, estimulando a proliferação de células endoteliais e sua organização em estruturas tubulares (JOHNSON; WILGUS, 2014; RIBATTI, 2014).

A formação do tecido de granulação é caracterizada pela acentuada migração de células endoteliais e fibroblastos para o local da lesão. Plaquetas e a matriz extracelular da ferida aumentam a expressão de TGF- β e PDGF otimizando a migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais, além de incrementar a produção de matriz extracelular (DARBY et al., 2014).

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos, estruturando-se em densa e dinâmica rede resultante de sua constante deposição e reabsorção. Sua produção depende da ativação de fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos alternativamente ativados. Ao longo de todo o processo de reparo a deposição de colágeno varia em termos quantitativos e qualitativos (TREDGET; LEVI; DONELAN, 2014).

No final da primeira semana após a lesão tem início a fase de maturação, podendo se prolongar por muitos meses dependendo de fatores como a presença de infecções, idade do indivíduo, estado nutricional e doenças concomitantes; o mais importante processo observado nessa fase é a reorganização da matriz extracelular pela atividade de diferentes collagenases produzidas por fibroblastos e miofibroblastos e a substituição do colágeno imaturo, tipo III, por colágeno tipo I, o que confere maior

resistência da pele cicatrizada à aplicação de tensão (figura 1) (DARBY et al., 2014).

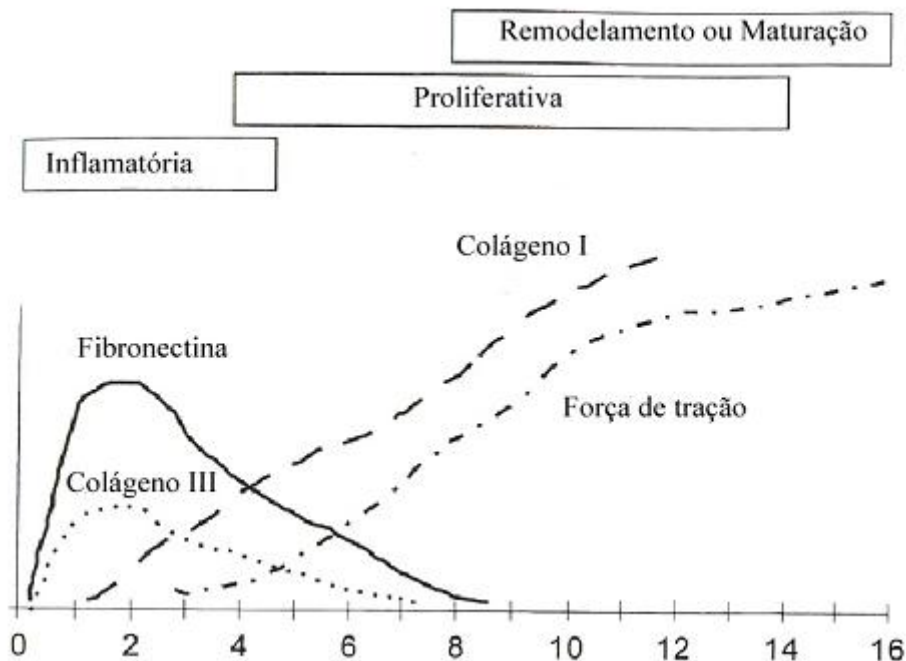


Figura 1: Deposição de colágeno ao longo das fases de reparo tecidual e sua correlação com o aumento da força de tração. Fonte: Campos; Borges-Branco e Groth, (2007).

As técnicas convencionalmente utilizadas no tratamento de feridas por queimaduras variam em conformidade com a extensão da lesão, profundidade, área corporal acometida, idade e estado prévio de saúde do indivíduo. Prevenção de processos infecciosos, remoção de tecidos necróticos, técnicas de desbridamento, procedimentos de enxertia e farmacoterapia são rotineiramente utilizados no tratamento de tais feridas (AZEVEDO et al, 2002).

Em lesões por queimadura de terceiro grau o desbridamento cirúrgico seguido de curativo oclusivo constitui o cuidado convencional adotado na maioria dos centros clínicos que se dedicam ao tratamento destas lesões. Agentes umidificantes como a glicerina e microbicidas como a sulfatiazida de prata a 2% são incorporados ao curativo oclusivo para favorecer o processo de reparo e prevenir infecções (WOLF; TOMPKINS; HERNDON, 2014).

Devido ao sucesso e progresso destes procedimentos nas últimas décadas, o percentual de pacientes que sobrevivem a lesões por queimaduras aumentou significativamente. O aumento nas taxas de sobrevivência implica no aumento do número de indivíduos que passam a apresentar graves disfunções motoras e problemas de ordem psicoemocional e social em consequência às contraturas cicatriciais e deformidades estéticas resultantes (VANDER VEER et al. 2009).

No âmbito das novas perspectivas terapêuticas que se desenvolveram nas últimas décadas, a terapia celular é vista como uma das abordagens mais promissoras para a reconstrução morfológica e restauração funcional de lesões cutâneas por queimaduras. A aplicação efetiva de populações celulares capazes de otimizar os processos de reparo e regeneração tecidual em diferentes condições clínicas depende de vários fatores. De particular importância, é o reconhecimento de fontes abundantes de células, com grande potencial terapêutico. (GIMBLE; GUILAK; BUNNELL, 2010).

Embora o tecido adiposo tenha sido inicialmente considerado apenas um local de armazenamento de substratos para produção de energia e regulação térmica, atualmente, diversas atribuições de natureza endócrina e imunoregulatória também são vistas como aspectos fundamentais de sua atividade fisiológica. Enxertos autólogos de tecido adiposo são utilizados com frequência no tratamento de lesões traumáticas e disfunções estéticas apresentando resultados variáveis (GENTILE et al., 2012).

O fracionamento dos componentes celulares do tecido adiposo por digestão enzimática e posterior centrifugação do material levantou novas possibilidades de utilização deste tecido em terapia regenerativa. Embora inicialmente o foco estivesse voltado para o uso dos adipócitos maduros, localizados na região superior da solução tecidual após a centrifugação, diferentes estudos começaram a explorar as aplicações terapêuticas da fração estromal vascular (FEV), depositada no fundo do frasco (TABIT et al., 2012).

A FEV é formada por populações de células linfóides e mielóides, fato que ressalta a contribuição do tecido adiposo nos processos imunoregulatórios. Células endoteliais, linfócitos, mielócitos, pericítos, pré-adipócitos e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDA) fazem parte

de sua composição e apresentam, na dependência dos estímulos presentes no microambiente tecidual, considerável plasticidade, capacidade proliferativa e de diferenciação em distintas linhagens celulares (GENTILE et al., 2012).

Métodos de cultivo *in vitro* em frascos plásticos acrescidos de meio de cultura e soro fetal bovino podem ser utilizados para isolar e enriquecer as CTDA da FEV, que apresentam grande capacidade de se aderir ao plástico. Aproximadamente uma a cada 30 células da FEV irão se ligar à superfície plástica, permitindo a expansão desta população particular de células. Por suas características imunofenotípicas e o grande repertório de citocinas e fatores de crescimento passíveis de serem produzidos, as CTDA tem sido apontadas como uma das principais causas dos efeitos terapêuticos observados em estudos que empregaram FEV em diferentes condições clínicas (GIMBLE; NUTTALL, 2011).

CTDA presentes na FEV apresentam claras vantagens em relação a outras células mesenquimais para fins regenerativos. Suas vantagens em relação às células-tronco derivadas da medula óssea (CTDM), por exemplo, incluem facilidade de isolamento, diminuição de morbidade do doador, relativa abundância, potencial de diferenciação em diferentes linhagens celulares e alta velocidade de expansão (NIE et al, 2011).

Segundo Torres et al. (2007) o tecido adiposo coletado pode produzir de 2 a 3 x10⁸ células tronco para cada 300 mL de material coletado, comparado ao material extraído da medula óssea, capaz de gerar apenas 1 célula tronco para cada 10⁵ células estromais. Sendo assim, as CTDA apresentam excelente relação custo / benefício para sua aplicação em terapia celular (KOKAI; MARRA; RUBIN, 2014).

Diferentes estudos investigaram o potencial terapêutico da FEV e de CTDA expandidas por cultivo em variados modelos pré-clínicos e clínicos de patologia.

Aplicação de FEV em lesões por queimadura de segundo grau em ratos promoveu a aceleração do reparo tecidual pelo aumento da proliferação celular, neovascularização, redução da inflamação e aumento da atividade de fibroblastos. Resultados semelhantes foram observados em estudo utilizando CTDA no tratamento de lesões por queimadura de terceiro grau em camundongos. Aumento da síntese de colágeno, do número de

macrófagos e linfócitos e redução da área de superfície da ferida foram exibidos pelo grupo tratado com CTDA comparado ao controle (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014; KARIMI et al., 2014).

Foi observado que o uso de FEV apresenta grande potencial terapêutico no tratamento de indivíduos portadores de esclerose múltipla. Efeito anti-inflamatório e regenerativo na aceleração do reparo de fístulas de Crohn evidencia o possível papel imunomodulatório sistêmico desempenhado pelas células componentes da FEV (RIORDAN et al., 2009).

Yoo e Lim (2010) mostraram que a aplicação de CTDA em modelos de ferida cutânea experimental em ratos é capaz de acelerar o fechamento da ferida, assim como promover reepitalização parcial e aumento da deposição de tecido de granulação.

Collawn et al. (2012) verificaram que a adição de CTDA a culturas organotípicas de pele humana equivalente, promove a aceleração do reparo de feridas induzidas por Laser de alta potência. Dois dias após a indução da lesão as culturas realizadas com CTDA apresentavam recuperação completa, exibindo o tecido cutâneo reconstituído em suas múltiplas camadas.

Natesan et al. (2013) investigaram o uso de CTDA extraídas de pele desbridada em pacientes queimados em associação a moldes constituídos de fibrina e colágeno em hidrogel bilaminado para a construção de tecido dermal vascularizado equivalente. Os animais tratados com a combinação de células e molde apresentaram cicatrização mais rápida que os controles. Fenótipos vasculares e estromais foram identificados nas culturas demonstrando a viabilidade do uso destas células na construção de equivalentes de pele vascularizados.

A implantação de CTDA em modelos caninos de lesão aguda da medula espinhal mostrou ser capaz de promover melhora da função neurológica devido à diferenciação parcial das células implantadas e promoção da regulação dos fatores de crescimento presentes no local da lesão (RYU, et al, 2009).

O grande potencial regenerativo das CTDA apresentado na literatura pode estar associado à produção de inúmeros fatores de crescimento e citocinas sinalizadoras da proliferação e diferenciação celular expressas por essas células no local da lesão, em particular, destacam-se a participação do VEGF, FGF e o Fator de crescimento do queratinócito (KGF). (MARRA, 2011).

A produção e distribuição temporal destes inúmeros fatores de crescimento e biomoléculas sinalizadoras participantes do processo de reparo correspondem ao eixo central de comando dos complexos eventos que caracterizam a cicatrização. Em vista da evidente necessidade de disponibilizar-se as pistas bioquímicas corretas nas diferentes fases do processo, diferentes abordagens baseadas na manipulação de fatores de crescimento vem sendo testadas em modelos *in vitro* e *in vivo* (NIE et al, 2011).

Aumento dos níveis locais e sistêmicos de fatores de crescimento como TGF- β , FGF, PDGF e Fator de crescimento epidermal (EGF) tem sido utilizados de forma separada ou associada em modelos de ferida cutânea apresentando resultados satisfatórios, porém, modestos (OBARA et al, 2005 ; ASHRAF et al, 2009). Nie et al. (2011) ainda ressaltam que dificuldades técnicas na administração contínua dos fatores de crescimento associadas ao enorme custo dessas substâncias tornam tais intervenções extremamente limitadas como estratégia terapêutica.

A presença de massa crítica celular adequada no local de lesão com características ideais para fins regenerativos disponibilizada pelo próprio organismo ou, oriunda de fontes externas, também vem sendo apontada como evento fundamental para o sucesso do reparo tecidual (JAMES et al, 2005).

As CTDA demonstram ser capazes de suprir as necessidades celulares requeridas, entretanto, a busca por agentes bioestimuladores aptos a induzir o máximo aproveitamento do material celular disponibilizado, exibindo uma relação entre o custo e o benefício favorável ainda persiste, constituindo um dos grandes desafios atuais no campo da terapia celular (TSENG et al, 2010 ; ABRAHANSE, 2012).

Dentre os diversos métodos utilizados na bioestimulação de células para fins regenerativos o emprego do Laser de baixa potência (LBP) em estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado ser uma alternativa promissora e de baixo custo no aumento da viabilidade, potencial proliferativo, de diferenciação e organização morfofuncional dessas células (ORON et al, 2008 ; EBRAHIMI et al, 2012).

O uso terapêutico do LBP vem sendo investigado há décadas, mostrando eficácia no tratamento de variadas condições patológicas tais como: doenças inflamatórias crônicas, disfunções articulares, aceleração do reparo tecidual de feridas cutâneas, redução de fadiga e dano muscular após exercício, neuropatias

periféricas, patologias bucais e dor crônica (BJORDAL, et al, 2003 ; FERRARESI et al, 2015).

A *International Electrotechnical Commission* (IEC) (2007) classifica os diferentes tipos de emissores Laser com base no conceito de Limites de Emissão Acessível (LEA). Equipamentos utilizados para fins de fotoativação biológica sem a geração de efeitos térmicos pertencem à classe 3B, e são chamados de LBP, nos quais a potência óptica útil do aparelho chega a aproximadamente 500mW.

Aplicações clínicas que exigem efeito fototérmico são realizadas com o uso de aparelhos da classe 4, estes emissores possuem potências ópticas úteis superiores a 500mW e são amplamente empregados em procedimentos cirúrgicos (IEC, 2007).

A aplicação do LBP exerce efeitos modulatórios da resposta inflamatória importantes nas fases iniciais do reparo tecidual. Modulação de mediadores químicos, edema, influência sobre a migração de células inflamatórias e incremento de fatores de crescimento foram observados em estudos clínicos e pré-clínicos, colaborando diretamente para o processo de cicatrização (PIVA et al, 2011 ; MORAIS J. M. et al, 2012).

Os mecanismos de ação da fotoestimulação com luz coerente vêm sendo estudados em modelos *in vitro* de culturas celulares e em diferentes modelos animais, mostrando a ativação de complexos eventos que se desenvolvem na membrana plasmática, mitocôndrias e no núcleo celular (JAVAD et al, 2010).

Abrahamse (2012) relata que utilizando parâmetros muito específicos de irradiação com LBP e de diodos emissores de luz é possível induzir atividades celulares como aumento da proliferação e viabilidade celular a partir da estimulação da atividade mitocondrial, o que leva ao aumento da produção de adenosina trifostato (ATP), síntese de ácido desoxiribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), ativação de cascatas de sinalização celular incluindo produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), liberação de óxido nítrico (NO), ativação da citocromo C oxidase e modificação da atividade da membrana de organelas intracelulares, do fluxo de cálcio e da expressão de proteínas relacionadas ao estresse.

Giannelli et al. (2013) mostraram que o efeito proliferativo da irradiação com laser de baixa potência de células tronco derivadas da medula óssea *in vitro* depende de eventos cruciais que se desenrolam na membrana celular, em

particular, a ativação de canais de K⁺ (Kir) específicos, sugerindo um papel fundamental dessas estruturas na coordenação do ciclo celular.

A irradiação com o LBP em culturas de células tronco mostrou ser capaz de promover o aumento da migração, proliferação e viabilidade celular, ativando a produção de proteínas e induzindo a diferenciação em células progenitoras variadas (DE VILLIERS et al, 2011). A aplicação do LBP associada à implantação local de células tronco derivadas da medula óssea em modelos de fratura e osteogênese imperfeita promoveu aceleração do reparo ósseo através do aumento da proliferação e diferenciação celular no local da lesão (EBRAHIMI et al, 2012).

Células-tronco mesenquimais irradiadas com LBP, previamente ao implante no coração de ratos infartados, mostraram ser capazes de aumentar sua taxa de sobrevivência e proliferação, diminuindo a formação de tecido cicatricial e promovendo aumento da angiogênese (ORON et al, 2008).

Poucos estudos foram realizados sobre a associação entre o uso de CTAD e a aplicação de LBP no tratamento de feridas cutâneas em modelos *in vivo*. Kim et al. (2012), implantaram CTDA caninas em modelos de lesão cutânea realizados em ratos atímicos e irradiaram as lesões com LBP. Os resultados mostraram que o grupo tratado com CTDA e o grupo tratado com CTDA e LBP apresentaram aceleração do reparo tecidual. Entretanto, o grupo no qual foi realizada a associação entre CTDA e LBP apresentou resultados superiores ao tratado com CTAD em termos de neovascularização, regeneração de anexos dérmicos, redução da apoptose de CTDA no leito da ferida e aumento da produção de fatores de crescimento.

Embora a perspectiva de associação entre CTDA e LBP pareça ser promissora, muitas questões ainda precisam ser respondidas para que seu uso clínico seja efetivado de forma segura e eficaz. Em relação ao aspecto bioestimulatório promovido pelo LBP, a determinação dos parâmetros de irradiação mais eficazes assume importância capital para o sucesso da terapia (ALMEIDA LOPES et al, 2001 ; ABRAHAMSE, 2012 ; KIM et al, 2012).

Em vista dos potenciais benefícios resultantes da associação destes recursos, investigações que enderecem os benefícios e riscos da terapia por FEV isolada ou associada ao LBP em comparação aos cuidados convencionais, assim como a elucidação de aspectos dosimétricos, são

necessárias para a determinação do possível papel destas terapias no tratamento de feridas por queimaduras.

HIPÓTESE

Foram elaboradas para este estudo três hipóteses:

1- a terapia por implantação de FEV proporciona melhores resultados no reparo de lesões por queimadura comparada ao cuidado convencional.

2- a associação entre terapia por implantação de FEV e LBP proporciona melhores resultados no reparo de lesões por queimadura comparada ao cuidado convencional.

3- os efeitos da associação entre terapia por implantação de FEV e LBP são dependentes da potência óptica útil selecionada para irradiação da lesão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar os efeitos da associação entre irradiação com LBP e implantação de FEV em modelos de ferida por queimadura de terceiro grau em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos microscópicos, macroscópicos e morfométricos entre a terapia por FEV e o cuidado convencional em queimaduras de terceiro grau.

- Comparar os efeitos microscópicos, macroscópicos e morfométricos entre a terapia por FEV aplicada isoladamente e em associação com o LBP utilizando diferentes parâmetros dosimétricos em modelos de ferida por queimadura em ratos.

- Comparar os efeitos microscópicos, macroscópicos e morfométricos entre a terapia por FEV em associação com o LBP com diferentes parâmetros dosimétricos e o cuidado convencional em modelos de ferida por queimadura em ratos.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo e local da pesquisa

Estudo experimental prospectivo realizado no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPSTP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os procedimentos de experimentação animal foram realizados no Biotério do IPTSP – UFG e os procedimentos de análise no Laboratório de Patologia Experimental no setor de Patologia do IPSTP – UFG.

4.2 Aspectos éticos e amostragem

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UFG e aprovada sob o número 035/13 (Anexo). A amostragem contou com 51 animais, ratos *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da UFG. No Biotério do IPTSP - UFG eles foram acomodados em número de três por gaiola e receberam ração comercial e água *ad libitum* autoclavada. As trocas das camas das gaiolas foram realizadas duas vezes por semana. Os animais foram manipulados de maneira cuidadosa, sempre pela manhã, pelo mesmo pesquisador treinado e supervisionado pelo médico veterinário responsável. A adaptação dos animais no ambiente proposto foi realizada a fim de priorizar seu bem estar.

4.3 Protocolo de lesão

No dia 0 os animais foram anestesiados com solução de 0,06 mL/Kg de ketamina a 10%, 0,01 mL/Kg de água para injeção e 0,03 mL/Kg de xylazina a 2% aplicada intraperitonealmente. Logo após, a tricotomia da região dorsal do animal foi realizada seguida de lesão térmica de terceiro grau por imersão da região dorsal do animal em água a 95°C por 14 segundos (MORAIS et al, 2012). Para tanto, o animal foi colocado em cilindro plástico de (PVC) com uma abertura de 2x2 cm e selado nas

extremidades. Após o procedimento foi realizada adição do analgésico Acetaminofeno na água dos animais na dose de 2mg/mL até dois dias após a lesão.

4.4 Protocolo de coleta e preparação da fração estromal

Após a eutanásia do animal doador por injeção letal de sódio thiopental na dose de 100 mg/kg, o segmento de tecido adiposo foi coletado da região intra-abdominal mediante dissecação cirúrgica (figura 2).



Figura 2: Extração de tecido adiposo intra-abdominal via dissecação cirúrgica de animal doador.

O tecido coletado foi em seguida acondicionado em frasco plástico tipo Falcon de 50 mL contendo 25 mL de solução transporte composta por *Phosphate Buffer Solution* (PBS) estéril a 2% e 1% de antibiótico (10^5 unidades/mL de penicilina e 10^5 μ g/mL de estreptomicina) e antimicótico (25 μ g/mL de anfotericina B) para ser conduzido ao fluxo laminar (figura 3):

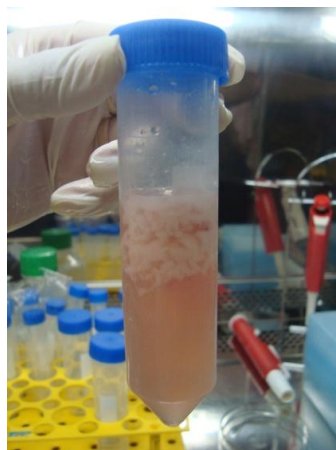


Figura 3: Solução de transporte contendo tecido adiposo coletado e conduzido ao fluxo laminar.

O material coletado foi em seguida lavado em PBS estéril a 2% por 3 vezes para remoção de componentes sanguíneos e depositado em placa de Petri estéril para separação mecânica feita por bisturi nº 15 (figura 4).

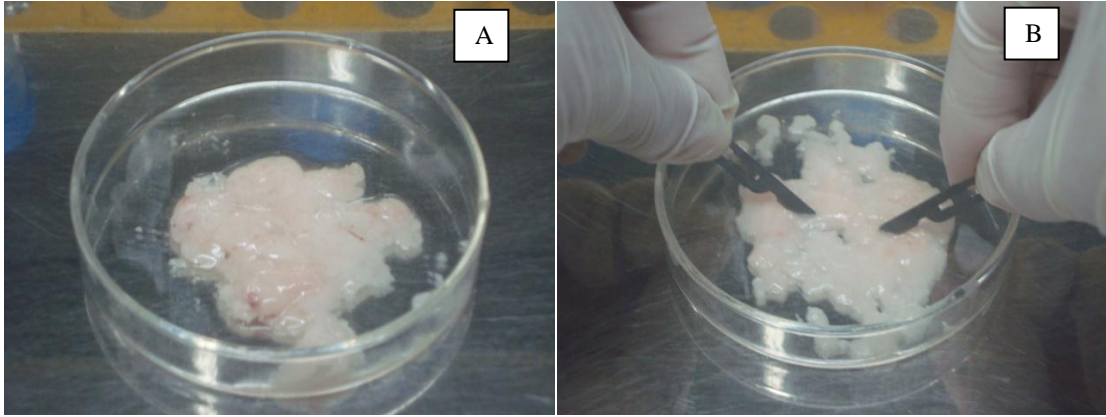


Figura 4: **A:** Tecido coletado após lavagem em PBS estéril a 2% e depositado em placa de Petri. **B:** Separação mecânica de tecido adiposo coletado feita em placa de Petri por uso de bisturi nº 15.

Após a separação mecânica, o tecido foi acondicionado em frasco plástico tipo Falcon de 50 mL contendo 20 mL de PBS estéril a 2% e 30 mg de colagenase tipo I para digestão enzimática tecidual em banho maria a 37°C por 50 minutos. O frasco foi agitado em vórtex a cada 20 minutos por 30 segundos e agitado manualmente a cada 5 minutos (figura 5).



Figura 5: Tecido adiposo após 50 minutos de digestão em solução de colagenase tipo I.

Após a digestão celular foi realizada a passagem do material em filtro de 70 µm. O conteúdo filtrado foi em seguida acondicionado em volumes iguais em

frascos plásticos tipo Falcon de 15 mL e centrifugados por 7 minutos a 1800 rotações por minuto (rpm) sendo observada formação de fração estromal vascular (FEV) no fundo do frasco (figura 6):

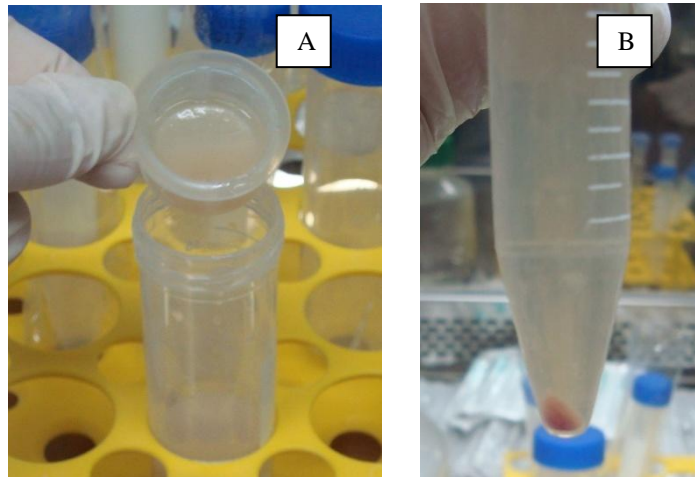


Figura 6: **A:** Filtração tecidual em filtro de 70 μm após digestão enzimática. **B:** FEV formada em fundo do frasco após centrifugação por 7 minutos a 1800 rpm.

Após o descarte do sobrenadante a FEV foi resuspendida em PBS estéril a 2% (figura 7) e uma solução de 20 μL de FEV e 20 μL de azul de tripan foi preparada em *ependorf* de 200 μL para contagem de células em Câmara de Neubauer.

A equação utilizada para a determinação da concentração de células foi:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{Número de quadrados contados}} = \text{n}^\circ \text{ de células por mL}$$

Na contagem foram utilizados os quatro quadrados dos cantos e fator de diluição igual a 2.

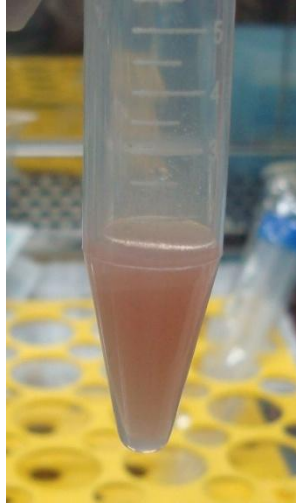


Figura 7: FEV resuspensa em PBS estéril a 2% após centrifugação.

Estando determinada a concentração celular da FEV, foi realizado cálculo para preparação das injeções utilizadas na implantação das células na ferida experimental. Cada injeção foi composta por volume de FEV equivalente à concentração de 5×10^5 cel/mL diluídas em PBS estéril a 2% compondo uma solução final de 1mL acondicionada em seringa de 1mL.

4.5 Protocolo de implantação da fração estromal vascular na ferida experimental

Foram realizadas 4 injeções subcutâneas nas bordas da ferida experimental utilizando agulhas de 13 x 3.8 mm com deposição de 0,2 mL por injeção e despejo de 0,2 mL no leito da ferida totalizando um volume de 1mL por ferida (figura 8).

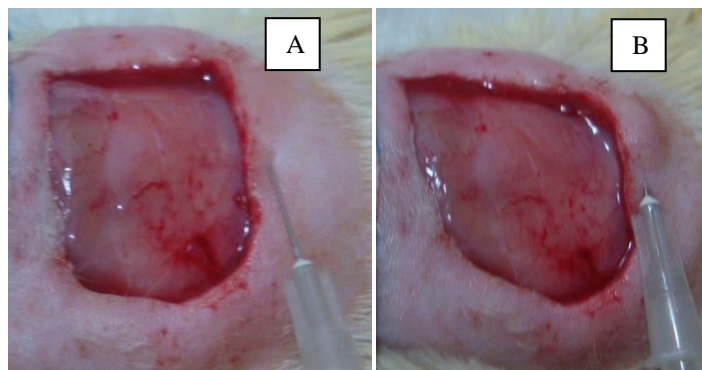


Figura 8: **A:** Procedimento de injeção subcutânea de FEV em borda de ferida experimental após desbridamento cirúrgico. **B:** Formação de pápula por deposição de FEV em terço superior de borda da ferida experimental.

4.6 Delineamento experimental

Neste estudo 51 ratos *Wistar* pesando entre 300 e 350 gramas com feridas experimentais por queimadura em conformidade com o protocolo descrito anteriormente foram divididos em cinco grupos. Cada grupo experimental foi composto por três animais e foram utilizados seis animais como doadores.

- **Grupo Controle (CT):** recebeu curativo oclusivo com sulfatiazida de prata a 2% e gaze estéril de malha de tecido Murim extrafina glicerinada. As gazes eram recobertas com veste confeccionada também em tecido Murim garantindo a permanência do curativo durante todo o tratamento, em conformidade com o cuidado convencional utilizado no Hospital de queimaduras de Goiânia (MORAIS et al, 2012). Os demais grupos receberam curativo oclusivo com a mesma metodologia do grupo controle exceto pela não aplicação de sulfatiazida de prata a 2%.

- **Grupo Fração Estromal Vascular (FEV):** recebeu a implantação de FEV em conformidade com o protocolo descrito anteriormente e proteção da ferida por curativo oclusivo.

- **Grupo Fração Estromal Vascular associado a L27 (FEVL27):** recebeu a implantação de FEV em conformidade com o protocolo descrito anteriormente, irradiação por Laser de baixa potência conforme os parâmetros descritos na tabela 2 e proteção da ferida por curativo oclusivo.

- **Grupo Fração Estromal Vascular associado a L53 (FEVL53):** recebeu a implantação de FEV em conformidade com o protocolo descrito anteriormente, irradiação por Laser de baixa potência conforme os parâmetros descritos na tabela 2 e proteção da ferida por curativo oclusivo.

- **Grupo Fração Estromal Vascular associado a L76 (FEVL76):** recebeu a implantação de FEV em conformidade com o protocolo descrito anteriormente, irradiação por Laser de baixa potência conforme os parâmetros descritos na tabela 2 e proteção da ferida por curativo oclusivo.

Três séries experimentais foram realizadas para todos os grupos. Antes da execução de cada série foi feita a coleta de tecido adiposo de um animal doador e preparação da FEV em conformidade com o protocolo descrito anteriormente:

- **Série 1:** Duração de 3 dias – dia 0: realização de ferida experimental no grupo a ser trabalhado; dia 1: aplicação única de FEV seguida de irradiação Laser em conformidade com os parâmetros descritos para cada grupo; dia 2: observação clínica; dia 3: irradiação Laser e procedimento de eutanásia (injeção letal de sódio thiopental 100 mg/kg) dos animais seguido de coleta de material para análise microscópica e fotografia da lesão para análise morfométrica e macroscópica digitalizada.

- **Série 2:** Duração de 7 dias - dia 0: realização de ferida experimental no grupo a ser trabalhado; dia 1: aplicação única de FEV seguida de irradiação Laser em conformidade com os parâmetros descritos para cada grupo realizada em dias alternados.; dia 7: última irradiação e procedimento de eutanásia dos animais seguido de coleta de material para análise microscópica e fotografia da lesão para análise morfométrica e macroscópica digitalizada.

- **Série 3:** Duração 30 dias - dia 0: realização de ferida experimental nos quatro grupos; dia 1: aplicação única de FEV seguida de irradiação Laser em conformidade com os parâmetros descritos para cada grupo realizada em dias alternados; dia 30: última irradiação e procedimento de eutanásia dos animais seguido de coleta de material para análise microscópica e fotografia da lesão para análise morfométrica e macroscópica digitalizada.

Ao longo do experimento a troca de curativos dos animais foi realizada em dias alternados logo após a irradiação Laser.

Para reduzir o estresse por contenção e manuseio dos animais foi feito uso do agente pré-anestésico Diazepam na dose de 2,5 a 5 mg/Kg via intraperitoneal (KAWANO et al., 2015). Durante todo o experimento não foi perdido qualquer animal, assim com não ocorreram infecção das lesões experimentais ou outras complicações.

4.7 Procedimento de desbridamento da ferida:

No primeiro dia após a indução da lesão (DAI) foi realizado o desbridamento cirúrgico da ferida com os animais sob anestesia geral (0,06 mL/Kg de ketamina a 10%, 0,01 mL/Kg de água para injeção e 0,03 mL/Kg de xylazina a 2% aplicada intraperitonealmente) conforme proposto pela intervenção padrão adotada no Hospital de Queimaduras de Goiânia para lesões de 3º grau (figura 9).

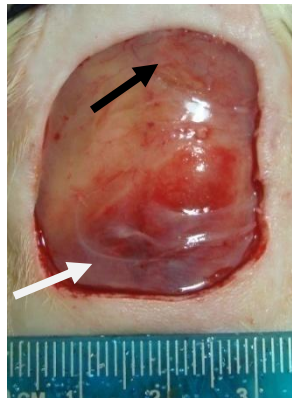


Figura 9: Lesão por queimadura experimental após desbridamento cirúrgico realizado no primeiro DAI. Seta branca: presença de foco hemorrágico causado pela lesão experimental. Seta preta: presença de edema causado pela lesão experimental.

4.8 Procedimento de irradiação Laser:

A irradiação Laser foi realizada pelo método pontual com a sonda sendo levemente pressionada contra a região de aplicação. Um ponto por borda foi irradiado em sua área central e dois pontos equidistantes foram irradiados no leito da ferida totalizando seis pontos de aplicação (figura 10). O procedimento foi realizado em dias alternados a partir do primeiro DAI até o último dia da série experimental.

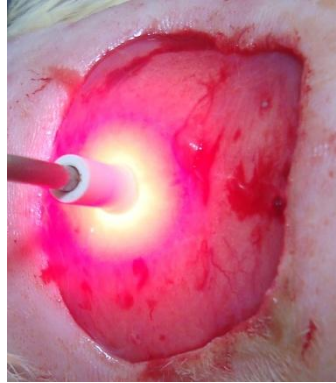


Figura 10: Irradiação Laser por método pontual aplicada no leito da ferida experimental.

4.9 Equipamento para irradiação Laser e definição de parâmetros dosimétricos:

Seguem abaixo as características técnicas do equipamento utilizado:

- Modelo: *Photon Lase III*
- Empresa de fabricação: DMC equipamentos (São Carlos-SP)
- Especificações técnicas:
 - . Tensão de Alimentação: 90 – 240 V
 - . Peso: 1,350 Kg
 - . Dimensão: 19 (L) x 22(P) x 13 (A) cm
 - . Comprimento de onda Laser vermelho: $660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$
 - . Potência óptica útil do emissor Laser vermelho: $100 \text{ mW} \pm 20 \%$
 - . Comprimento de onda Laser infravermelho: $808 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$
 - . Potência óptica útil do emissor Laser infravermelho: $100 \text{ mW} \pm 20 \%$

O espectro de potência selecionado para este estudo abrangeu os valores mínimo, médio e máximo gerados pelo equipamento, sendo estes 30mW, 60mW e 100mW, respectivamente.

No Laboratório de Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo, Instituto de Física-UFG, realizamos experimento com potenciômetro modelo 918D-SL-OD3, para averiguação das potências reais emitidas pelo equipamento utilizado no estudo. Os cálculos dosimétricos foram realizados utilizando os valores obtidos pelos testes e seguindo as diretrizes para seleção de parâmetros recomendadas por estudos

prévios sobre LBP no tratamento de lesões cutâneas (tabela 1) (EM; CHAVES; PIANCASTELLI, 2014; FIÓRIO et al., 2014).

Tabela 1: Média e desvio padrão de potência óptica útil do equipamento Laser utilizado no estudo averiguado por potenciômetro modelo 918D-SL-OD3.

Potência ajustada no aparelho (mW)	Média (mW)	Desvio Padrão
30	27,1954	$\pm 0,20613$
60	53,45053	$\pm 0,2363$
100	76,2679	$\pm 0,24234$

As figuras 11, 12 e 13 apresentam os gráficos obtidos durante os testes mostrando a oscilação de potência e o discreto declínio do seu valor médio ao longo de 60 segundos de emissão.

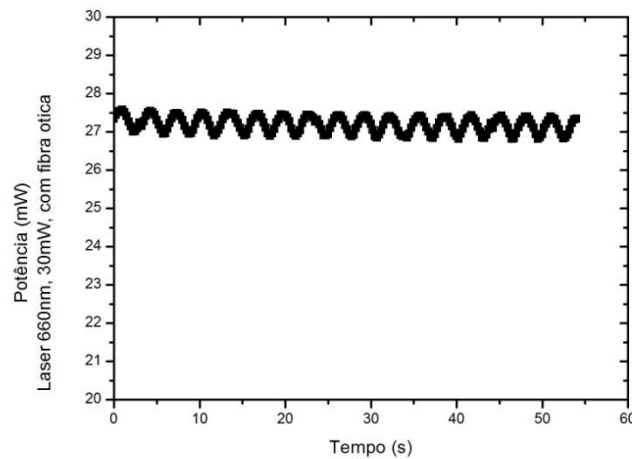


Figura 11: Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 30 mW por um tempo de 60 segundos. Potenciômetro modelo 918D-SL-OD3.

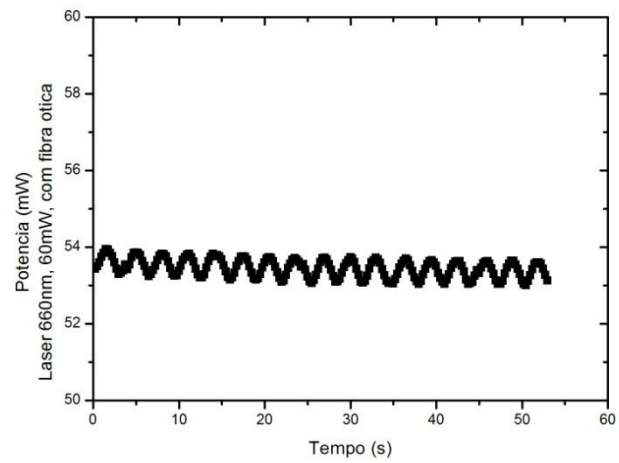


Figura 12: Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 60 mW por um tempo de 60 segundos. Potenciômetro modelo 918D-SL-OD3.

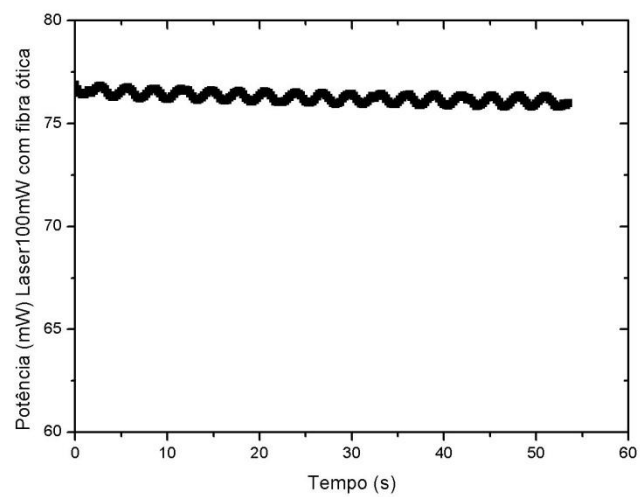


Figura 13: Emissão de potência do equipamento laser utilizado no estudo ajustado para 100 mW por um tempo de 60 segundos. Potenciômetro modelo 918D-SL-OD3.

Tabela 2: Parâmetros dosimétricos de irradiação Laser nos grupos experimentais.

Grupo	Comprimento de onda (nm)	Potência óptica útil (mW)	Área irradiada (cm²)	Irradiância (W/cm²)	Tempo de aplicação no leito por ponto (s)	Tempo de aplicação na borda por ponto (s)	Energia por ponto no leito (J)	Energia por ponto na borda (J)	Energia total por ferida (J)	Fluência por ponto leito (J/cm²)	Fluência por ponto borda (J/cm²)	Fluência total por ferida (J/cm²)
L27	660	27	0,0283	0,954	37	74	1	2	10	35	70	350
L53	660	53	0,0283	1,872	19	38	1	2	10	35	70	350
L76	660	76	0,0283	2,685	13	26	1	2	10	35	70	350

4.10 Avaliação macroscópica

Nos dias estabelecidos para análise, as lesões foram fotografadas e as fases do processo de reparo tecidual, inflamação, proliferação e maturação, foram macroscopicamente examinadas. Os seguintes parâmetros foram analisados: hiperemia, necrose, hemorragia, presença de crosta, tecido de granulação, fibrose e reepitelização. Todos estes parâmetros foram analisados de maneira subjetiva pelo mesmo pesquisador sem saber qual grupo estava sendo observado.

A análise qualitativa das lesões foi feita da seguinte maneira:

- A: ausente
- D: discreta – 1 a 25% da área da lesão.
- M: moderada – 26 a 50% da área da lesão.
- Ac: acentuada – acima de 51% da área da lesão.

4.11 Avaliação morfométrica

Para a análise da contração da ferida, todas as lesões foram fotografadas com câmera digital acoplada a suporte posicionado a 12 cm de distância da lesão e posteriormente as imagens foram analisadas com o *software Image J (NIH)* versão 1.3.1.

Na imagem, a área da ferida foi circulada pelo pesquisador usando o *software* mencionado sem conhecimento sobre o grupo em análise. Os valores foram calculados pela seguinte equação:

$$CL = \frac{\text{área } T^0 - \text{área } T^{\text{dias de eutanásia}}}{\text{área } T^0} \times 100$$

Onde CL = nível de contração, T^0 = dia da indução da lesão e $T^{\text{dias de eutanásia}}$ = dias 7 e 30 após a indução da lesão.

4.12 Avaliação Microscópica

O tecido da lesão foi removido por procedimento de biópsia e acondicionado em formal aldeído a 10%. Posteriormente, o tecido foi incluído em parafina, seccionado em 4 μm , colocado em lâmina de vidro e corado com Hematoxilina e Eosina (H&E). As amostras das lesões cutâneas foram removidas de modo a incluir

as bordas da pele adjacente e todo o tecido cicatrizado profundo. Os processos patológicos gerais foram analisados na derme (tabela 3).

Tabela 3: Processos patológicos gerais analisados em diferentes tecidos de ferida de queimadura induzida em ratos.

Tecido	Processo patológico geral analisado
Derme	Fibrina, hemorragia, infiltração de PMN, MN, hiperemia, angiogênese, necrose do colágeno, fibroblastos, colágeno e reepitelização.

PMN: polimorfomucleares / MN: mononucleares.

A análise qualitativa das lesões foi feita da seguinte maneira:

- A: ausente
- D: discreta – 1 a 25% da lâmina.
- M: moderada – 26 a 50% da lâmina.
- Ac: acentuada – acima de 51% da lâmina.

4.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *software Sigma Stat 2.3*. Estatística descritiva foi aplicada para determinar o desvio médio e padrão e para avaliar as diferenças entre os grupos analisados. Foi atribuído o valor 0 às variáveis ausentes, 1 para as discretas, 2 para as moderadas e 3 para as acentuadas. As variáveis foram testadas para distribuição normal e variância homogênea. Quando apresentaram distribuição normal, análise de variância foi utilizada e quando a distribuição não foi normal ou a variância não foi homogênea, testes não paramétricos foram utilizados (Kruskal-Wallis). As diferenças notadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Macroscópica

No terceiro, sétimo e trigésimo DAI foi possível observar os processos patológicos gerais associados às fases de resposta inflamatória, proliferação e maturação respectivamente.

No terceiro dia DAI (quadro 1, figura 14) a área de necrose no grupo CT foi significativamente maior comparada aos demais grupos ($p < 0,05$). Diferença estatisticamente significativa também foi observada entre o grupo FEVL27 e os grupos FEVL53 e FEVL76 ($p < 0,05$), mostrando maior tendência de necrose tecidual em CT e FEVL27.

O grupo CT apresentou hiperemia mais acentuada comparado aos grupos FEVL53 e FEVL76 ($p < 0,05$), o mesmo foi observado no grupo FEV comparado aos grupos FEVL27, FEVL53 e FEVL76 ($p < 0,05$) e no grupo FEVL27 comparado ao grupo FEVL53 ($p < 0,05$). De forma geral, a hiperemia se mostrou mais acentuada nos grupos CT, FEV e FEVL27.

Quadro 1. Macroscopia de processos patológicos gerais em queimaduras aos 3 dias após a indução da lesão.

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p		
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac			
Necrose				100 (3)		100 (3)							33,3 (1)	66,6 (2)							66,6 (2)	33,3 (1)	<0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76 FEV vs FEVL27 FEVL27 vs FEVL53 FEVL27 vs FEVL76
Crosta	33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)				100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			66,6 (2)	33,3 (1)					>0,05
Hemorragia	33,3 (1)	66,6 (2)				66,6 (2)	33,3 (1)			33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)							100 (3)		>0,05
Hiperemia		33,3 (1)	66,6 (2)				33,3 (1)	66,6 (2)		66,6 (2)	33,3 (1)		100 (3)								66,6 (2)	33,3 (1)	<0,05* CT vs FEVL53 CT vs FEVL76 FEV vs FEVL27 FEV vs FEVL53 FEV vs FEVL76 FEVL27 vs FEVL53
Tecido de granulação	100 (3)				100 (5)				100 (5)				100 (5)				100 (5)						>0,05
Reepitelização	100 (3)				100 (5)				100 (5)				100 (5)				100 (5)						>0,05
Fibrose	100 (3)				100 (5)				100 (5)				100 (5)				100 (5)						>0,05
Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significativo. Versus – vs.																							

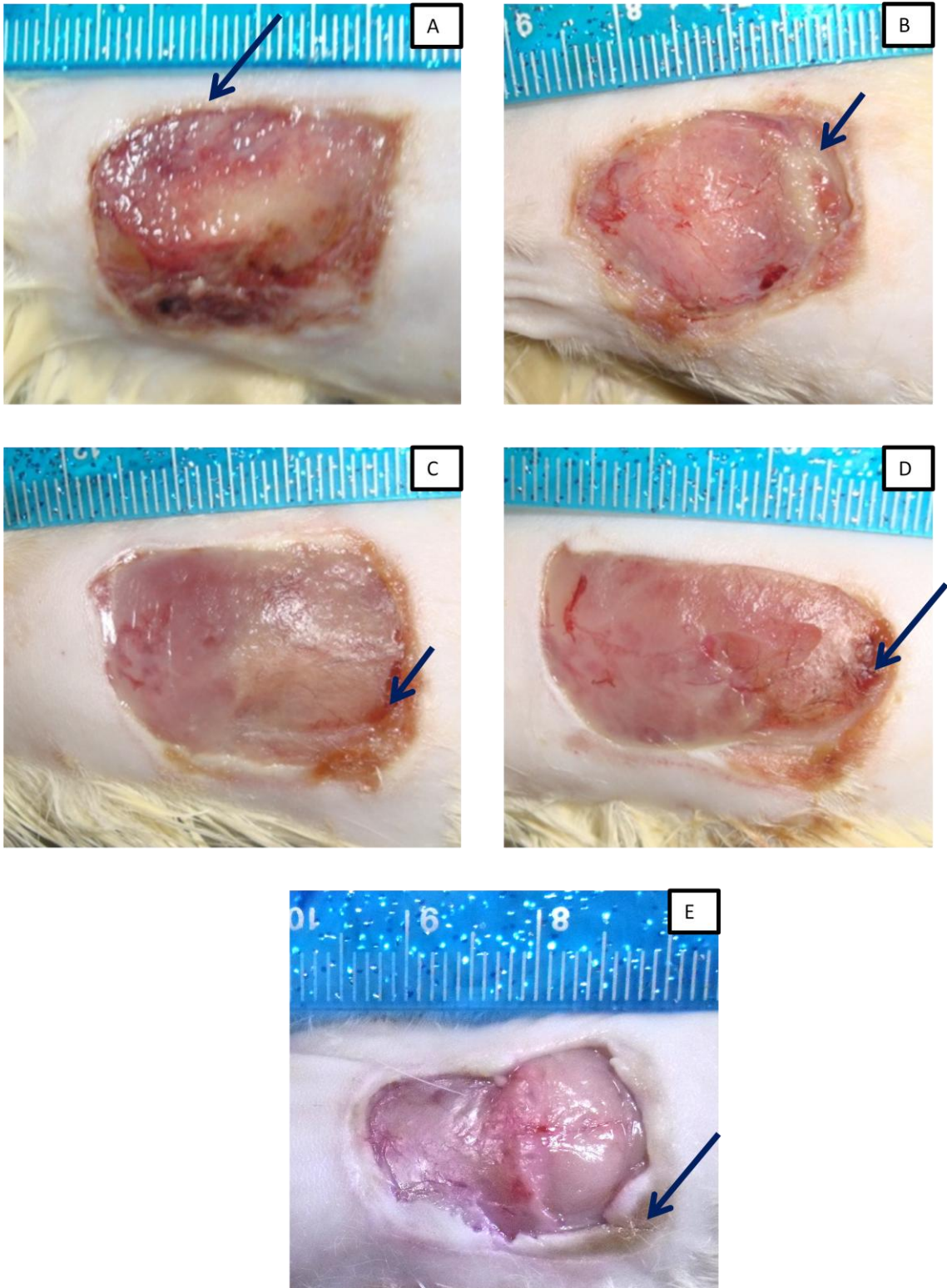


Figura 14: Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocadas em ratos no 3º dia após a indução da lesão. **A**: ferida no grupo FEV. Seta: hiperemia em região marginal de borda superior. **B**: ferida no grupo FEVL27. Seta: área de necrose em borda superior. **C**: ferida no grupo FEVL53. Seta: formação de crosta em borda inferior. **D**: ferida no grupo FEVL76. Seta: formação de crosta em borda inferior. **E**: ferida em CT. Seta: Área de necrose em toda borda inferior e lateral esquerda.

No sétimo DAI (quadro 2, figura 15) foi observada acentuada área de necrose no grupo CT comparado aos grupos FEVL27 e FEVL76 ($p < 0,05$), nos quais não foram encontrados tecidos necrosados.

Ocorreu maior formação de tecido de granulação em FEVL27 e FEVL76 comparado ao grupo CT ($p < 0,05$) e um grau mais acentuado de reepitelização foi observado em FEVL27 e FEVL76 comparado ao grupo CT ($p < 0,05$) e em FEVL76 comparado a FEVL53 ($p < 0,05$).

Quadro 2. Macroscopia de processos patológicos gerais em queimaduras aos 7 dias após a indução da lesão.

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	
Necrose			33,3 (1)	66,6 (2)	33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)		100 (3)					66,6 (2)	33,3 (1)		100 (3)				<0,05* CT vs FEVL27 CT vs FEVL76
Crosta		33,3 (1)	66,6 (2)		100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			33,3 (1)	66,6 (2)			33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)		>0,05
Hemorragia		33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)			33,3 (1)	66,6 (2)			>0,05
Hiperemia	33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)			66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)		33,3 (1)	66,6 (2)			>0,05
Tecido de granulação	66,6 (2)	33,3 (1)				33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)		33,3 (1)		66,6 (2)		33,3 (1)	66,6 (2)				33,3 (1)	66,6 (2)	<0,05* CT vs FEVL27 CT vs FEVL76
Reepitelização	100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)				66,6 (2)	33,3 (1)		66,6 (2)	33,3 (1)				33,3 (1)	66,6 (2)		<0,05* CT vs FEVL27 CT vs FEVL76 FEVL53 vs FEVL76
Fibrose	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				>0,05
Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significante. Versus – vs.																					

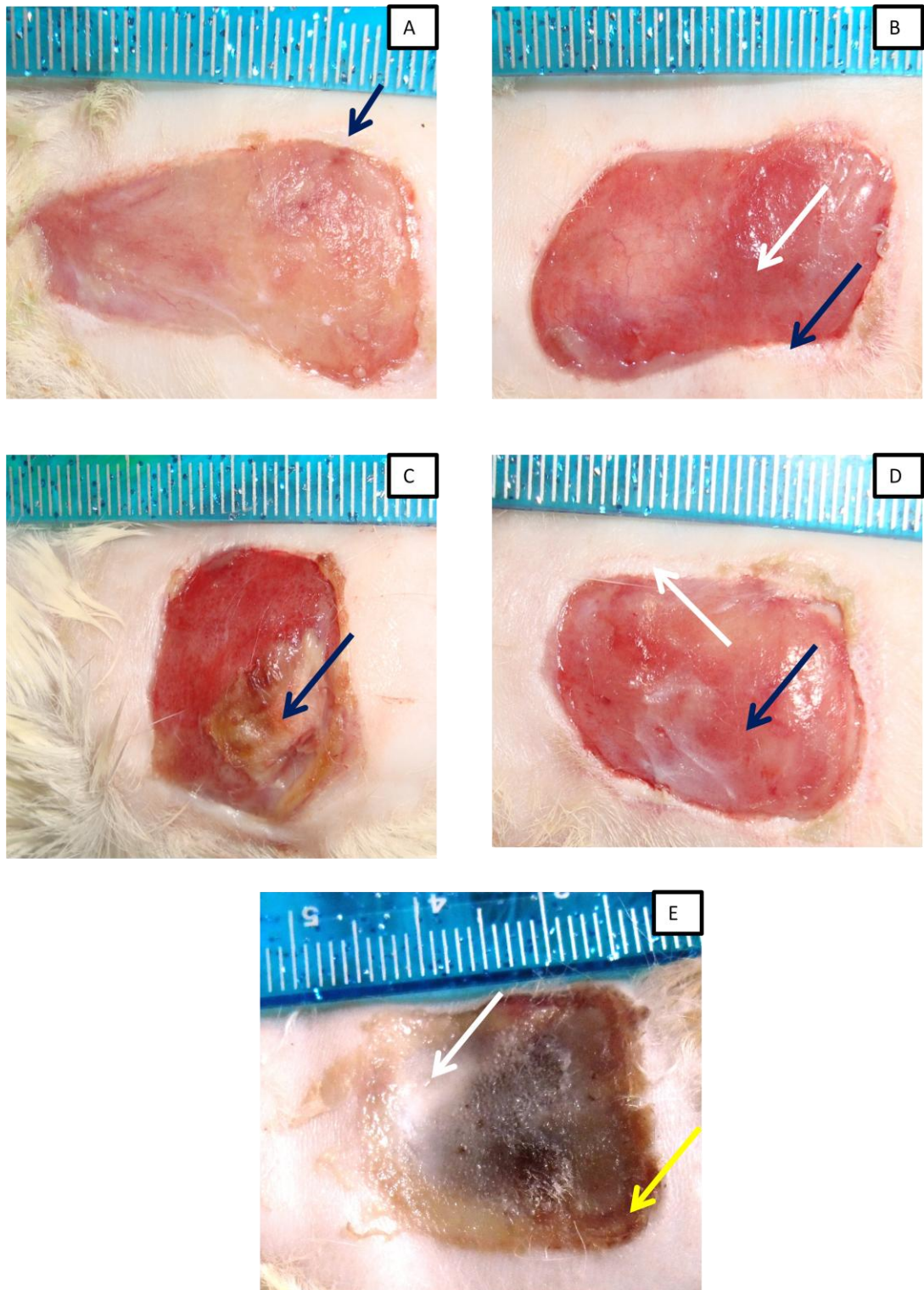


Figura15: Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocadas em ratos no 7º dia após a indução da lesão. **A:** Ferida no grupo FEV. Seta: Região de reepitelização. **B:** Ferida no grupo FEVL27. Seta azul: região de reepitelização. Seta branca: área de granulação. **C:** Ferida no grupo FEVL53. Seta: área de necrose. **D:** Ferida no grupo FEVL76. Seta branca: área de reepitelização. Seta azul: área de granulação. **E:** Ferida em CT. Seta branca: área de necrose em porção central do leito da ferida. Seta amarela: área de crosta.

No trigésimo DAI foram observados os processos característicos da fase de maturação e remodelamento tecidual (quadro 3, figura 16). Diferença estatisticamente significativa foi encontrada em relação à hemorragia e crosta que se apresentaram discretamente elevadas no grupo FEVL53 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Quadro 3. Macroscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 30 dias após a indução da lesão.

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	
Necrose	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				> 0,05
Crosta	100 (3)				100 (3)				100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)				< 0,05* CT vs FEVL53 FEV vs FEVL53 FEVL27 vs FEVL53 FEVL76 vs FEVL53
Hemorragia	100 (3)				100 (3)				100 (3)					100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)			<0,05* CT vs FEVL53 FEV vs FEVL53 FEVL27 vs FEVL53 FEVL76 vs FEVL53
Hiperemia	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				>0,05
Tecido de granulação	66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)				100 (3)				100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			>0,05
Reepitelização			33,3 (1)	66,6 (2)				100 (3)				100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)		>0,05
Fibrose				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)	>0,05

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significativo. Versus – vs.

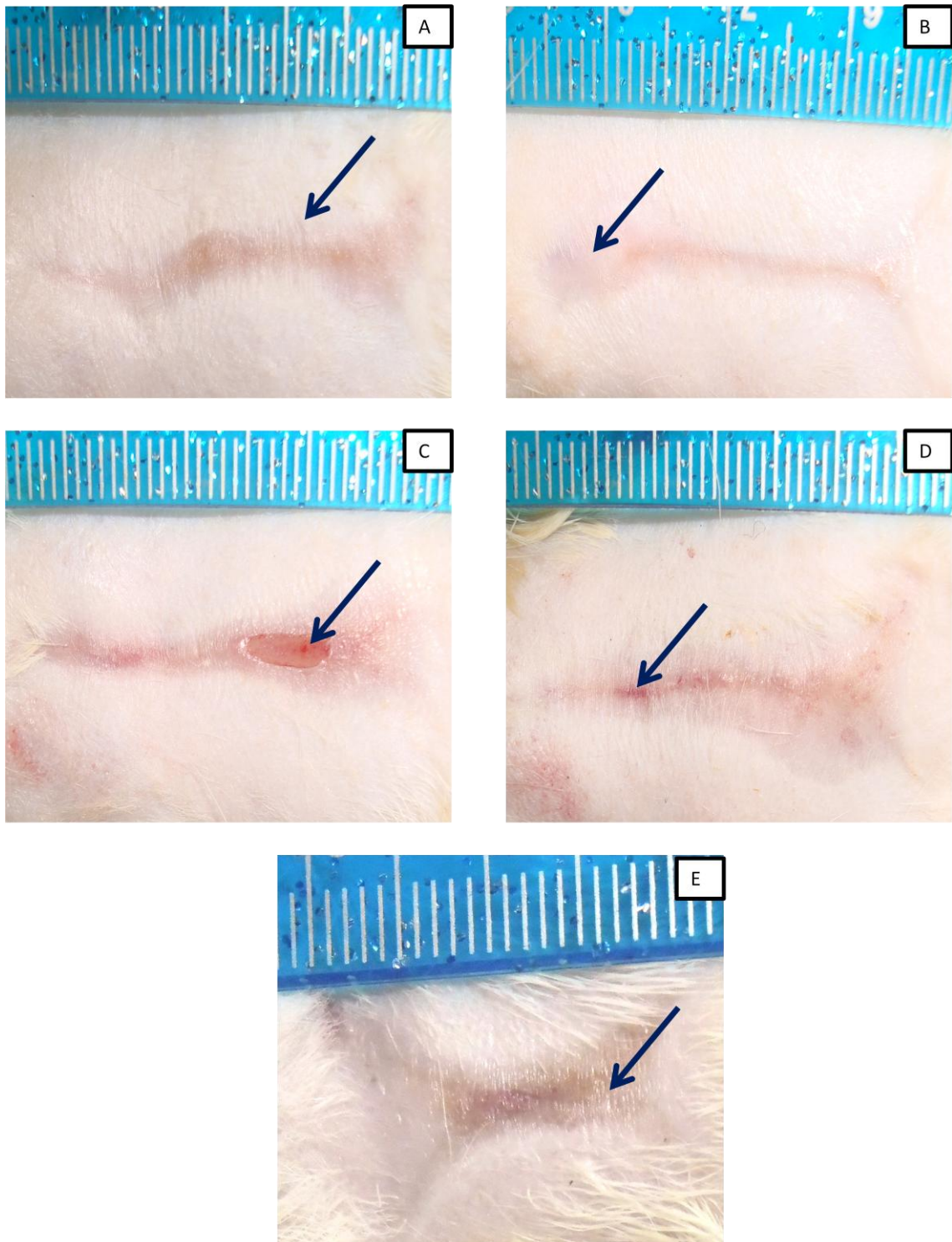


Figura 16: Lesões por queimadura de terceiro grau experimentalmente provocadas em ratos no 30º dia após a indução da lesão. **A:** Ferida no grupo FEV. Seta: região de fibrose tecidual. **B:** Ferida no grupo FEVL27. Seta: região de fibrose tecidual **C:** Ferida no grupo FEVL53. Seta: área de ferida aberta e discreta hemorragia. **D:** Ferida no grupo FEVL76. Seta: discreta região de granulação tecidual. **E:** Ferida em CT. Seta: região de fibrose tecidual acentuada.

5.2 Avaliação microscópica

No terceiro, sétimo e trigésimo DAI os processos patológicos gerais associados às fases inflamatória, proliferativa e de maturação foram observados por microscopia de luz.

No terceiro DAI (quadro 4, figuras 17 e 18) foi observada área de hemorragia maior nos grupos FEVL27, FEVL53 e FEVL76 comparado ao grupo CT ($p < 0,05$).

Todos os grupos experimentais tratados apresentaram maior conteúdo de fibrina comparado ao grupo CT ($p < 0,05$). O grupo FEVL53 também apresentou quantidade significativa maior de fibrina comparado aos grupos FEVL27 e FEVL76 ($p < 0,05$).

Presença de infiltrado polimorfonuclear foi maior em todos os grupos experimentais tratados em relação ao grupo CT ($p < 0,05$).

A angiogênese foi mais acentuada no grupo FEVL53 comparada ao grupo CT ($p < 0,05$). Diferença estatisticamente significativa também foi encontrada na avaliação da proliferação dos fibroblastos, que se mostrou maior nos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76 comparada ao grupo CT ($p < 0,05$).

Quadro 4. Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 3 dias após a indução da lesão

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	
Necrose do colágeno				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)	P > 0,05
Hemorragia	100 (3)					100 (3)				66,6 (2)		33,3 (1)			100 (3)				100 (3)		P < 0,05* CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Hiperemia		33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)		33,3 (1)			66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)		P > 0,05
Fibrina	100 (3)						100 (3)			66,6 (2)		33,3 (1)				100 (3)		33,3 (1)	66,6 (2)		P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76 FEVL53 vs FEVL76 FEVL53 vs FEVL27
Infiltrado PMN	100 (3)					33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)			P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Infiltrado MN	33,3 (1)	66,6 (2)				66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)			P > 0,05
Angiogênese	66,6 (2)	33,3 (1)				66,6 (2)	33,3 (1)		33,3 (1)	66,6 (2)				100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)			P < 0,05* CT vs FEVL53
Fibroblasto	100 (3)					100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)				66,6 (2)	33,3 (1)			66,6 (2)	33,3 (1)		P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Colágeno	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				P > 0,05
Reepitelização	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				P > 0,05

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significante. Versus – vs.

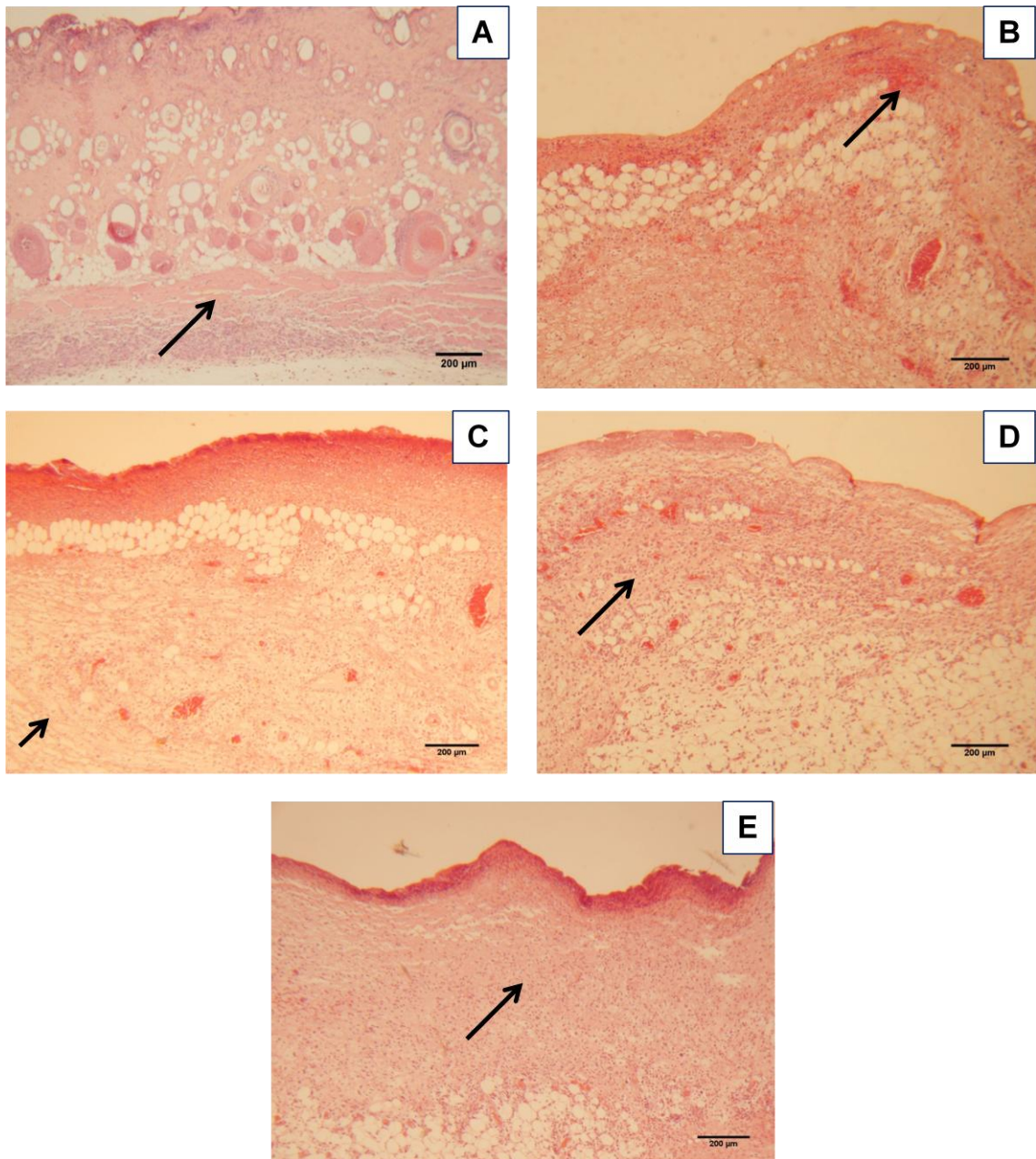


Figura 17: Fotomicroscopia da derme vista em visão panorâmica (em aumento de 5 x) no terceiro dia após a indução da lesão. **A:** Grupo FEV. Seta: Presença moderada de fibrina (H&E:200µm). **B:** Grupo FEVL27. Seta: hemorragia moderada em derme superficial (H&E:200µm). **C:** Grupo FEVL53 (H&E:200µm). Seta: presença acentuada de fibrina em derme profunda. **D:** Grupo FEVL76 (H&E:200µm). Seta: presença moderada de fibrina em derme profunda. **E:** Grupo CT (H&E:200µm). Seta: Infiltrado inflamatório moderado.

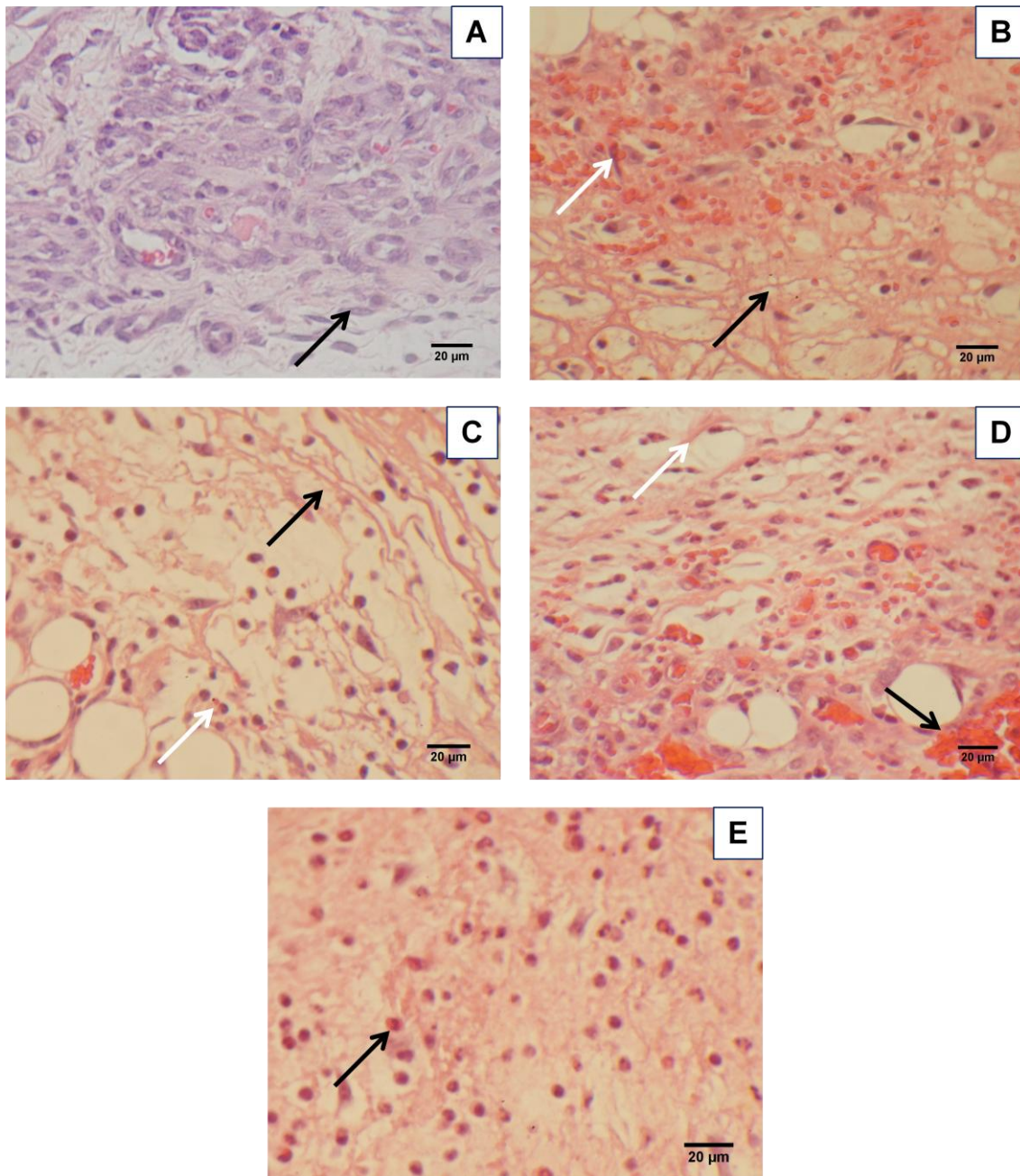


Figura 18: Fotomicroscopia em aumento de 40 x no 3º dia após a indução da lesão. **A:** Detalhe da derme no Grupo FEV (H&E:20µm). Seta: presença moderada de fibroblastos. **B:** Detalhe da derme no grupo FEVL27 (H&E:20µm). Seta branca: Quadro hemorrágico moderado. Seta preta: presença moderada de aglomerados de fibrina. **C:** Detalhe da derme no grupo FEVL53 (H&E:20µm). Seta preta: presença acentuada de aglomerados de fibrina. Seta branca: moderada angiogênese. **D:** Detalhe da derme no grupo FEVL76 (H&E:20µm). Seta preta: hemorragia moderada. Seta branca: presença moderada de fibrina. **E:** Detalhe da derme no grupo CT (H&E:20µm). Seta: infiltrado Polimorfonuclear.

No sétimo DAI (quadro 5, figuras 19 e 20) foi observada maior necrose do colágeno no grupo FEVL53 comparado aos grupos FEV, FEVL27 e CT ($p < 0,05$). Resposta hiperêmica acentuada foi encontrada em FEVL27 comparada ao grupo CT ($p < 0,05$).

O infiltrado polimorfonuclear, quantidade de fibroblastos, angiogênese e o conteúdo de colágeno foram maiores em todos os grupos tratados comparados ao grupo CT ($p < 0,05$). O grupo FEVL27 apresentou também maior quantidade de fibroblastos comparado aos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76 ($p < 0,05$).

Reepitelização significativa foi observada nos grupos FEVL27 e FEVL76 comparados ao grupo CT ($p < 0,05$).

Quadro 5. Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 7 dias após a indução da lesão.

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	
Necrose do colágeno		100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)			33,3 (1)	66,6 (2)					100 (3)	33,3 (1)	33,3 (1)		33,3 (1)	p <0,05* FEVL53 vs FEV FEVL53 vs FEVL27 FEVL53 vs CT	
Hemorragia		33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)			33,3 (1)		66,6 (2)			66,6 (2)	33,3 (1)	p >0,05	
Hiperemia	33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)			33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)				100 (3)		33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)	33,3 (1)	p <0,05* CT vs FEVL27	
Fibrina	100 (3)				100 (3)				100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)		33,3 (1)	p >0,05	
Infiltrado PMN	100 (3)					100 (3)				100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)	33,3 (1)	p >0,05	
Infiltrado MN	33,3 (1)	66,6 (2)						100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)			33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)	p <0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76	
Angiogênese	66,6 (2)	33,3 (1)						100 (3)				100 (3)			100 (3)				100 (3)	p <0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76	
Fibroblasto	100 (3)						100 (3)					100 (3)			100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)	P<0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76 FEVL27 vs FEV FEVL27 vs FEVL53 FEVL27 vs FEVL76
Colágeno	100 (3)						100 (3)			100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)				33,3 (1)	66,6 (2)	P<0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76	
Reepitelização	100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)				100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)				100 (3)		P<0,05* CT vs FEVL27 CT vs FEVL76	

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste de Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significativo. Versus – vs.

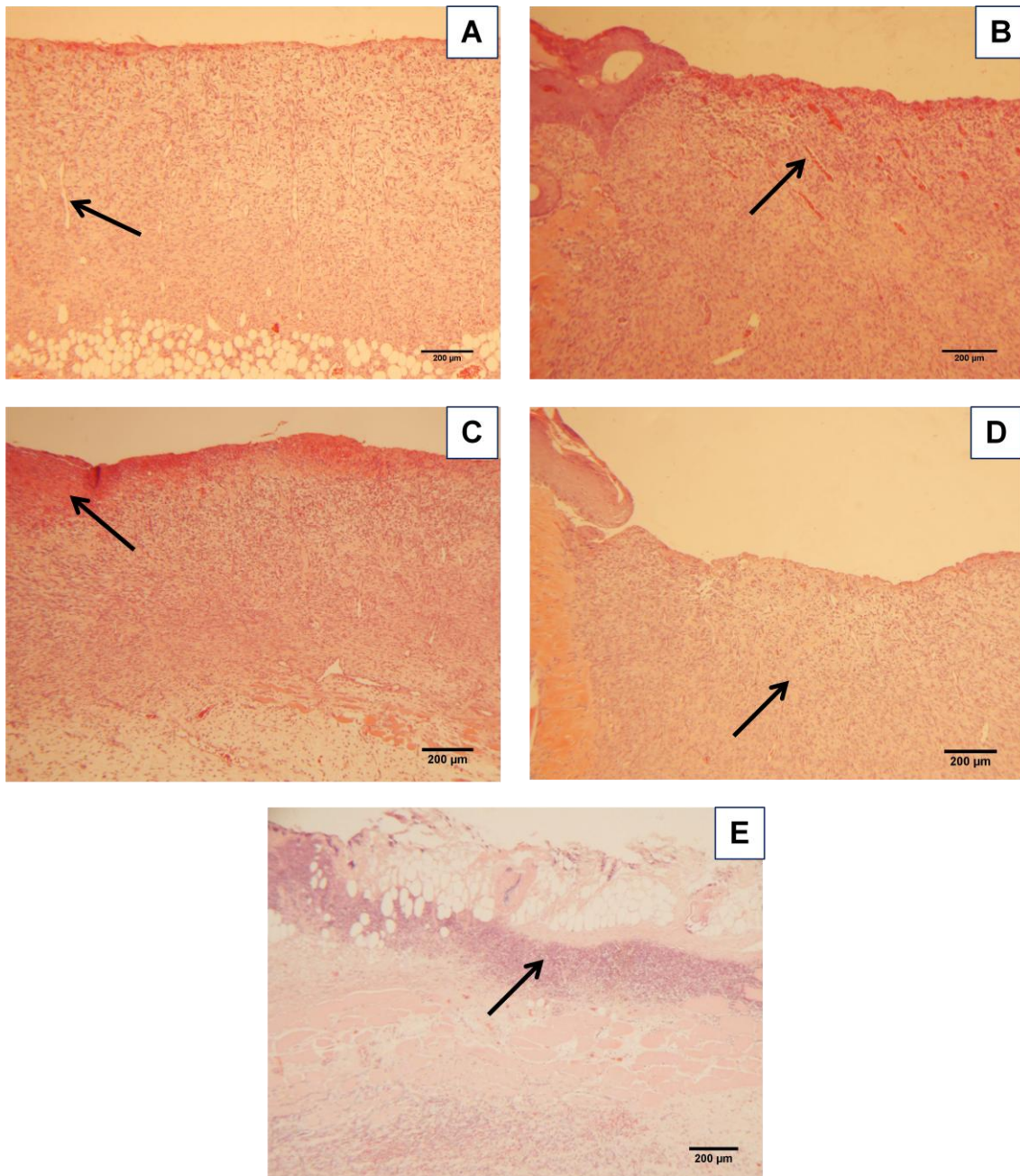


Figura 19: Fotomicroscopia da derme vista em visão panorâmica (em aumento de 5 x) no sétimo dia após a indução da lesão. **A:** Grupo FEV (H&E:200µm). Seta: angiogênese acentuada. **B:** Grupo FEVL27 (H&E:200µm). Seta: quadro hiperêmico moderado. **C:** Grupo FEVL53 (H&E:200µm). Seta: necrose do colágeno acentuada. **D:** Grupo FEVL76 (H&E:200µm). Seta: infiltrado mononuclear. **E:** Grupo CT (H&E:200µm). Seta: presença acentuada de infiltrado inflamatório.

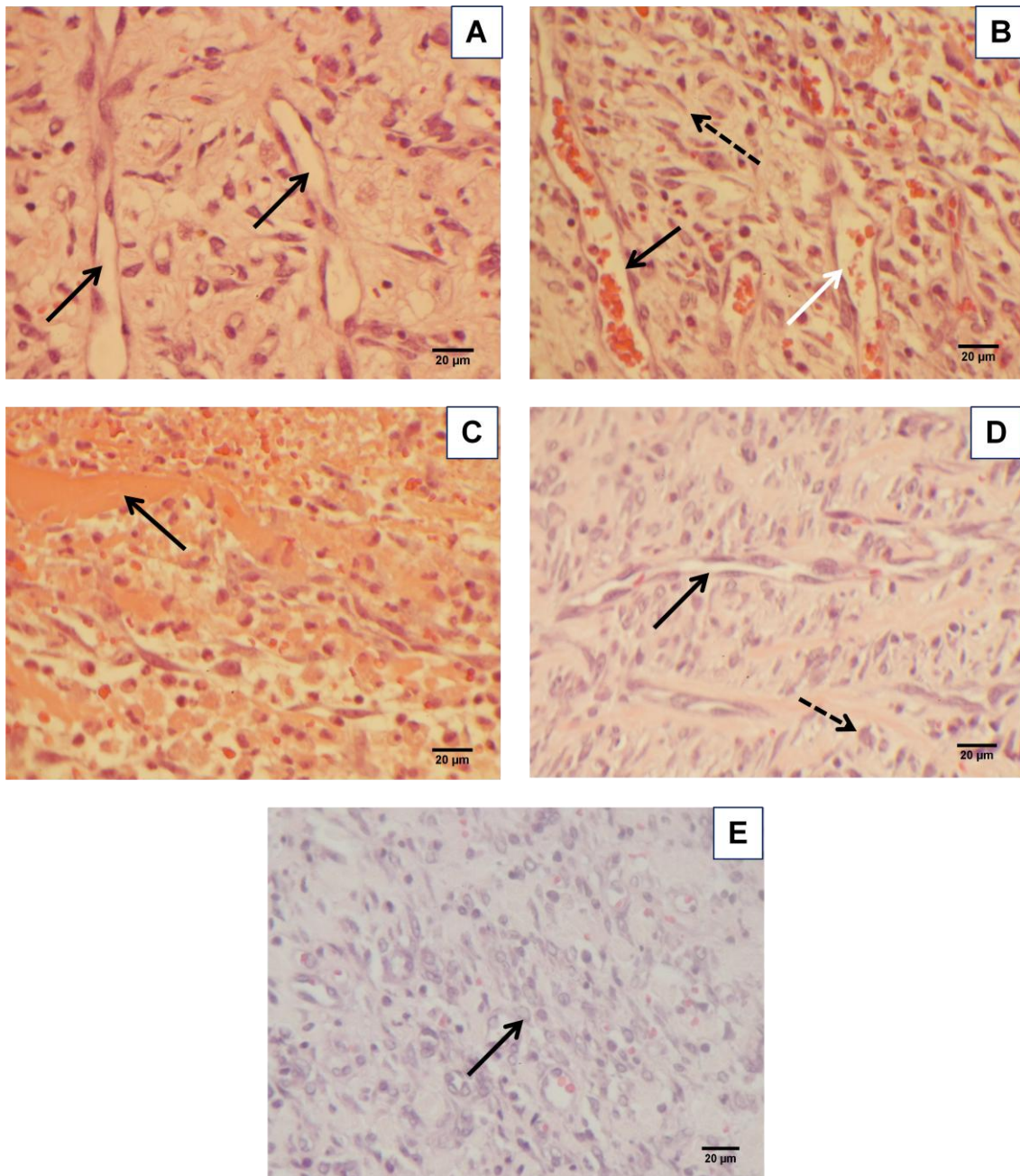


Figura 20: Fotomicroscopia no aumento de 40 x no sétimo dia após a indução da lesão. **A:** Detalhe da derme no grupo FEV (H&E:20µm). Setas: proliferação vascular acentuada. **B:** Detalhe da derme no grupo FEVL27 (H&E:20µm). Seta preta: vasodilatação associada a quadro hiperêmico tecidual; Seta branca: brotamento vascular acentuado; Seta pontilhada: presença acentuada de fibroblastos. **C:** Detalhe da derme no grupo FEVL53 (H&E:20µm). Seta: necrose acentuada do colágeno. **D:** Detalhe da derme no grupo FEVL76 (H&E:20µm). Seta preta: proliferação vascular acentuada. Seta pontilhada: infiltrado mononuclear acentuado. **E:** Detalhe da derme no grupo CT (H&E:20µm). Seta: infiltrado mononuclear acentuado.

No trigésimo dia após a indução da lesão os processos patológicos gerais da fase de maturação e remodelamento foram observados (quadro 6, figuras 20 e 21).

Maior grau de hiperemia, reepitelização e colágeno foi visto em todos os grupos tratados comparados ao grupo CT ($p < 0,05$). O infiltrado polimorfonuclear se mostrou acentuado no grupo FEVL53 em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$) e o infiltrado mononuclear foi maior nos grupos FEVL53 e FEVL76 comparados ao grupo CT ($p < 0,05$).

Quadro 6. Microscopia dos processos patológicos gerais em queimaduras aos 30 dias após a indução da lesão.

Processos patológicos	CT (n = 3) % (n)				FEV (n = 3) % (n)				FEVL27 (n = 3) % (n)				FEVL53 (n = 3) % (n)				FEVL76 (n=3) % (n)				p
	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	A	D	M	Ac	
Necrose do colágeno	33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				P > 0,05
Hemorragia	100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)				100 (3)				66,6 (2)	33,3 (1)			P > 0,05
Hiperemia	100 (3)						100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)				100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)	P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Fibrina	100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				100 (3)				P > 0,05
Infiltrado PMN	100 (3)				100 (3)				100 (3)				33,3 (1)	66,6 (2)			100 (3)				P < 0,05* FEVL53 vs CT FEVL53 vs FEV FEVL53 vs FEVL27 FEVL53 vs FEVL76
Infiltrado MN	33,3 (1)	66,6 (2)					100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)					100 (3)			66,6 (2)	33,3 (1)	P < 0,05* CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Angiogênese		66,6 (2)	33,3 (1)				100 (3)				20 (1)				20 (1)				66,6 (2)	33,3 (1)	P > 0,05
Fibroblasto		33,3 (1)	66,6 (2)				100 (3)					100 (3)				100 (3)				100 (3)	P > 0,05
Colágeno		33,3 (1)	66,6 (2)					100 (3)								100 (3)				100 (3)	P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76
Reepitelização			100 (3)					33,3 (1)	66,6 (2)			66,6 (2)	33,3 (1)			100 (3)			33,3 (1)	66,6 (2)	P < 0,05* CT vs FEV CT vs FEVL27 CT vs FEVL53 CT vs FEVL76

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: A – ausente; D – discreto; M – moderado; Ac – acentuado; e submetido ao teste Kruskal-Wallis. * Resultado estatisticamente significante. Versus – vs.

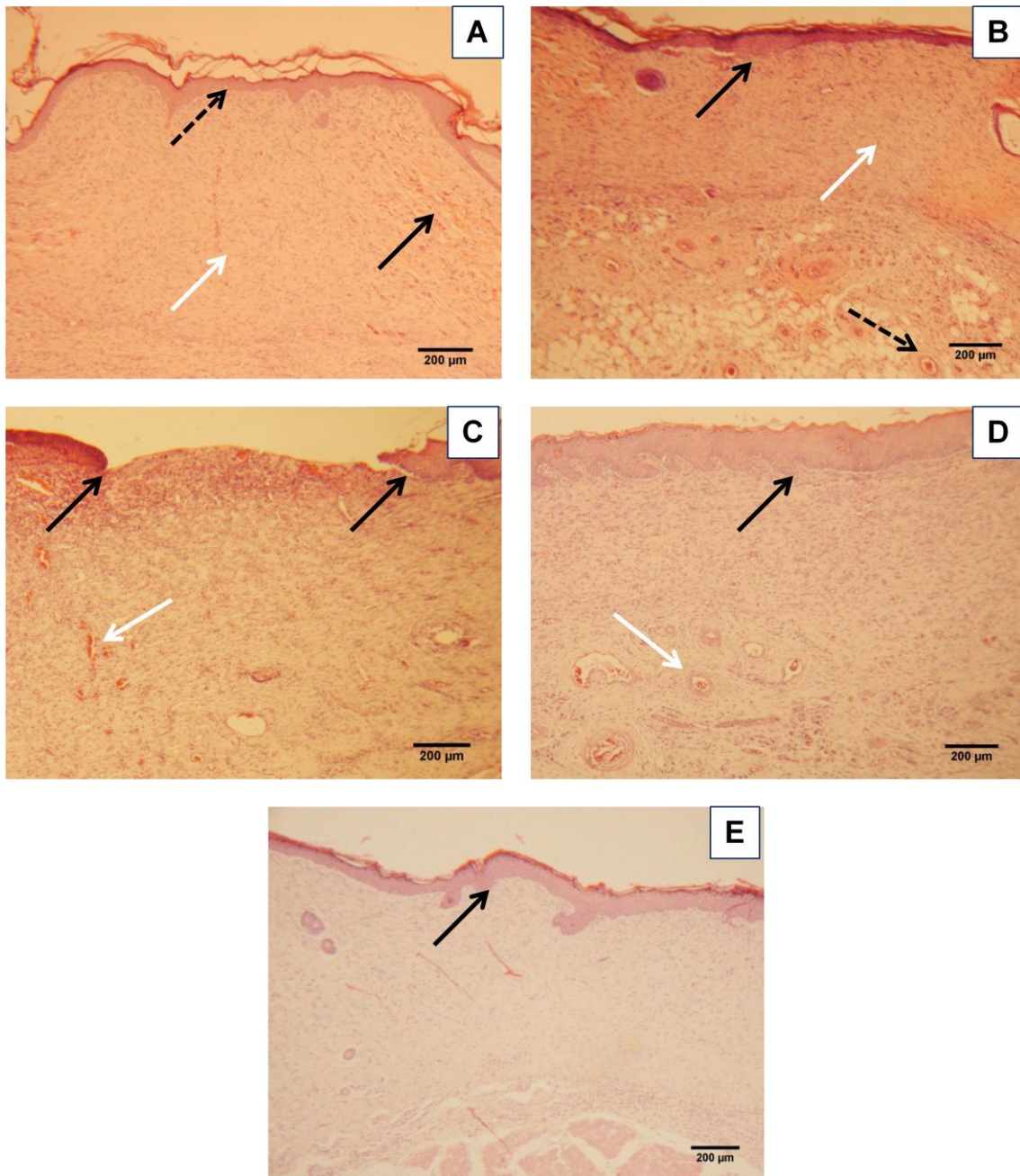


Figura 21: Fotomicroscopia da derme vista em visão panorâmica (em aumento 5x) no trigésimo dia após a indução da lesão. **A:** Grupo FEV (H&E: 200µm). Seta: reepitelização acentuada; Seta preta: hiperemia discreta; Seta branca: distribuição moderada de colágeno. **B:** Grupo FEVL27 (H&E: 200µm). Seta preta: reepitelização acentuada; Seta branca: distribuição moderada de colágeno; Seta pontilhada: vasodilatação discreta sugestiva de processo hiperêmico. **C:** Grupo FEVL53 (H&E: 200µm). Seta preta: reepitelização incompleta; Seta branca: vasodilatação moderada sugestiva de processo hiperêmico. **D:** Grupo FEVL76 (H&E: 200µm). Seta preta: reepitelização acentuada; Seta branca: vasodilatação discreta sugestiva de processo hiperêmico. **E:** Grupo CT (H&E: 200µm). Seta: reepitelização acentuada.

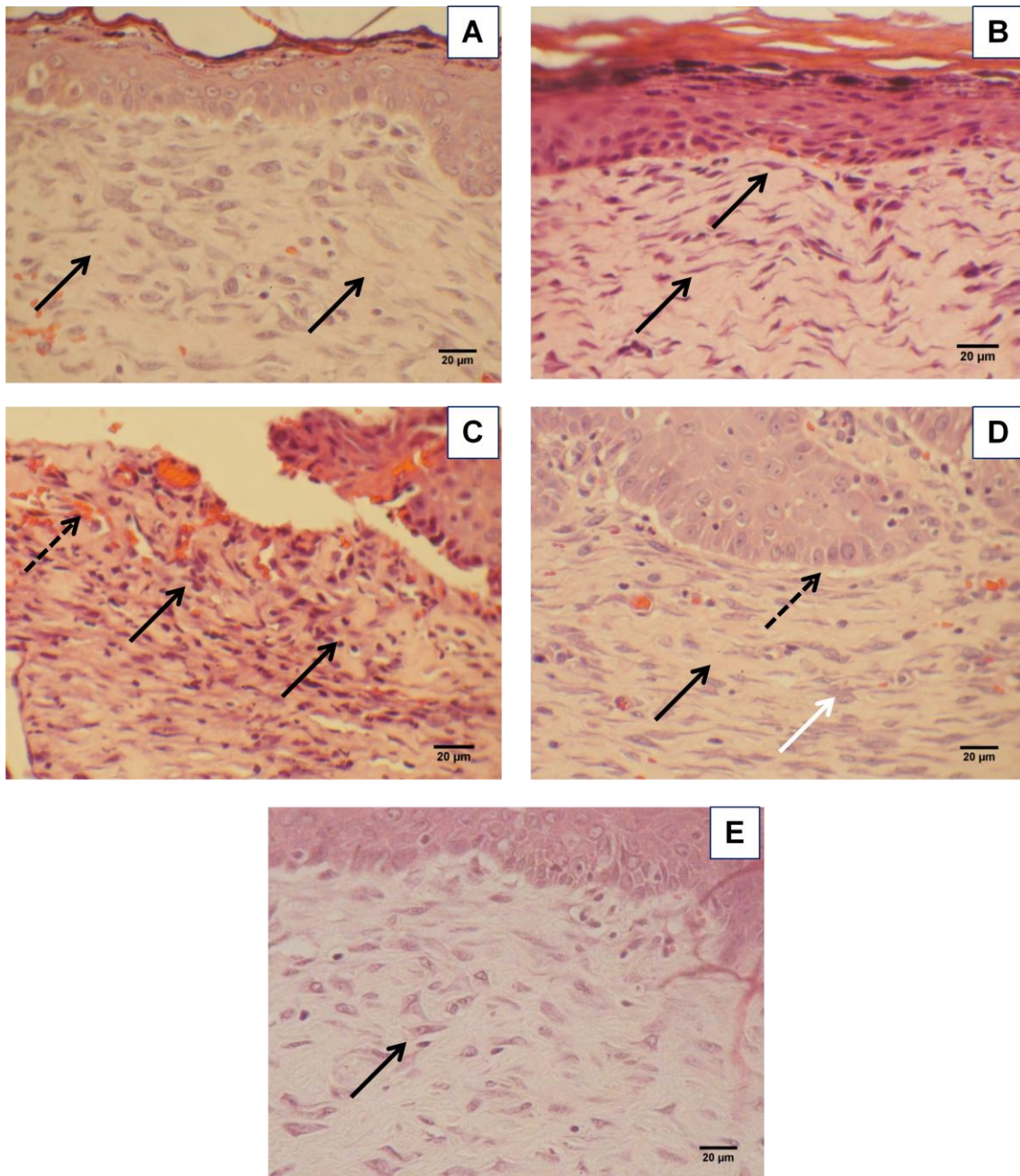


Figura 22. Fotomicroscopia no aumento 40 x no trigésimo dia após a indução da lesão. **A:** Detalhe da derme no grupo FEV (H&E:20µm). Setas: distribuição acentuada de colágeno. **B:** Detalhe da derme no grupo FEVL27 (H&E:20µm). Setas: distribuição acentuada de colágeno. **C:** Detalhe da derme no grupo FEVL53 (H&E:20µm). Seta pontilhada: vasodilatação sugerindo quadro hiperêmico discreto. Seta preta: presença moderada de infiltrado inflamatório. **D:** Detalhe da derme no grupo FEVL76 (H&E:20µm). Seta pontilhada: reepitelização; seta preta: distribuição acentuada de colágeno; Seta branca: presença discreta de infiltrado mononuclear. **E:** Detalhe da derme no grupo CT (H&E:20µm). Seta: presença moderada de infiltrado mononuclear.

5.3 Avaliação morfométrica

Na avaliação morfométrica da área de contração da ferida, o grupo FEVL27 apresentou redução consideravelmente maior da lesão em comparação com os demais grupos, entretanto, nenhum dos grupos experimentais tratados apresentou diminuição estatisticamente significativa ($p > 0,05$) comparados ao grupo CT (tabela 11).

No sétimo dia após a indução da lesão o grupo FEVL76 apresentou diminuição significativa da área da lesão apenas em comparação com o grupo FEVL53 ($p < 0,05$).

No trigésimo dia após a indução da lesão foi observada maior redução da área da ferida no grupo CT comparado ao grupo FEVL76 ($p < 0,05$) e do grupo FEVL27 comparado aos grupos FEVL53 e FEVL76 ($p < 0,05$).

Tabela 4. Análise morfométrica do percentual de contração da ferida nos dia 7 e 30 após a indução da lesão em ratos.

Grupo experimental	7 DAÍ		30 DAÍ		p (7 DAÍ)	p (30 DAÍ)
	Média (%)	DP	Média (%)	DP		
CT	14,476	±04	88,207	±2,6	p < 0,05*	p < 0,05*
FEV	15,023	±7,1	88,203	±5,8		
FEVL27	15,217	±5,0	95,170	±0,9	FEVL53 vs FEVL76 CT vs FEVL76 FEVL27 vs FEVL53 FEVL27 vs FEVL76	
FEVL53	6,727	±3,0	79,900	±6,1		
FEVL76	20,423	±2,8	75,120	±8,8		

DP: desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise microscópica mostrou no terceiro DAI, aumento significativo do infiltrado polimorfonuclear em todos os grupos tratados comparados ao CT. Este resultado sugere que a aplicação de FEV isoladamente e em associação com o LBP promove uma amplificação da resposta inflamatória inicial.

A participação do LBP neste primeiro momento da inflamação provavelmente está associada ao incremento da produção de substâncias quimiotáticas como a IL-1 α e histamina pelos queratinócitos e a degranulação de mastócitos (XUAN et al., 2013).

Este efeito foi relatado utilizando-se diferentes comprimentos de onda no espectro visível e invisível, particularmente de 450nm a 904nm, sugerindo que a magnitude do efeito pró-inflamatório está associada a outros fatores dosimétricos como a irradiância e o tempo de exposição à luz (HSIEH et al., 2014).

Além disso, aumento da vasodilatação após exposição ao LBP foi descrito apenas 2 minutos após a irradiação, estando associado à modulação do óxido nítrico (ON), um radical livre sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) que age como um neurotransmissor na musculatura lisa vascular. Dentre as diferentes células capazes de produzir ON após estimulação com LBP estão os macrófagos e em menor grau as células endoteliais (BURAVLEV et al., 2014).

A irradiação com o LBP também mostrou ser capaz de acelerar a migração de neutrófilos para a área de lesão, provocando a otimização da atividade fagocítica e bactericida, favorecendo a resolução precoce da fase inflamatória (GÁL et al., 2006).

O efeito de amplificação da inflamação inicial ocorre em paralelo com a redução do edema local, refletindo a remoção acelerada de fluido intersticial da lesão. O padrão morfológico dos vasos linfáticos é restaurado

pela irradiação com LBP em poucos dias sem provocar anormalidades na permeabilidade linfática (SMOOT et al., 2014).

Esses efeitos sugerem que ao menos em parte, a significativa redução da área de necrose nos grupos tratados com LBP comparados ao CT, observada na análise macroscópica no presente trabalho, pode estar associada à potencialização da resposta inflamatória inicial com consequente aumento da remoção de *debris* e preparação do leito da ferida para a fase proliferativa.

A inflamação é um requisito fundamental para a efetiva reparação tecidual. Entretanto, o episódio inflamatório inicial pode influenciar a evolução da cicatrização tanto de forma positiva quanto negativa (MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

Evidência sobre o papel crucial da resposta inflamatória no processo de reparo foi encontrada por Gourevitch et al., (2014) ao observar reparo tecidual mais efetivo em camundongos *Murphy Roths Large* (MRL), utilizados como modelos animais em estudos sobre doenças autoimunes, portanto, capazes de desenvolver respostas inflamatórias acentuadas após lesões.

Kyritsis et al., (2012) relacionaram respostas inflamatórias mais intensas com maior grau de regeneração axonal e neuroproteção em modelos de lesão neural em peixes zebra. Eming; Martin e Tomic-Canic, (2014) enfatizaram a importância da modulação da resposta inflamatória no reparo de feridas cutâneas.

Substâncias pró-inflamatórias como leucotrieno B4 e a lipoxina A4 podem atuar como sinais regulatórios para a proliferação e diferenciação de células tronco somáticas tornando-as aptas a substituir células lesadas (WADA et al., 2006).

khoshvaghti et al., (2011) observaram que a irradiação com LBP a 890nm, pulsado a 80Hz e com irradiância de apenas $1\text{mW}/\text{cm}^2$ por 856 segundos, foi capaz de amplificar o número e a degranulação de mastócitos no primeiro dia após lesão por queimadura de terceiro grau em ratos e reduzir seu número aos 7 e 21 dias.

A modulação do número, fenótipo e degranulação de mastócitos parece estar associada com a qualidade final do reparo tecidual em feridas.

Atividade intensa e de curta duração destas células foi identificada em lesões que evoluíram com maior grau de regeneração, diminuição de fibrose e melhor funcionalidade (GOUREVITCH et al., 2014).

Diversos estudos ressaltam a eficácia do LBP na redução do processo inflamatório em diferentes modelos animais (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) e humanos (GUPTA et al., 2014), em contraste com os resultados encontrados no presente estudo. Esta aparente discrepância parece estar relacionada aos parâmetros dosimétricos utilizados nos diferentes estudos.

Análise de curvas dose-resposta em diferentes modelos de estudo sobre a ação do LBP em sistemas biológicos revelou a característica bifásica do efeito de irradiação (PINAR et al., 2012). Uso de irradiâncias acima de $100\text{mW}/\text{cm}^2$ e tempos de exposição prolongados com mais de 60s, em geral, provocam efeitos de natureza inibitória em diferentes tecidos, enquanto irradiâncias e tempos de exposição mais baixos foram associados a efeitos estimulatórios (HUANG et al., 2009).

Não encontramos no presente estudo diferenças significativas na análise do infiltrado inflamatório no 3º DAI entre os grupos que receberam LBP em diferentes irradiâncias FEVL27, FEVL53 e FEVL76, possivelmente, por estarem todos abaixo de $100\text{mW}/\text{cm}^2$. A apreciação do comportamento bifásico do LBP sugere que os efeitos predominantemente estimulatórios da inflamação observados neste estudo sejam consequências, em parte, das irradiâncias e tempos de exposição reduzidos que foram empregados (CHUNG et al., 2012).

No presente estudo também foi observado, na análise microscópica, aumento significativo de fibrina em todos os grupos tratados em relação ao CT e do grupo FEVL53 comparado aos grupos FEVL27 e FEVL76.

A adesão da fibronectina nos aglomerados de fibrina possibilita a rápida migração de fibroblastos e células endoteliais para o local da lesão, promovendo alças de retroalimentação responsáveis por aumentar a produção de quimiotáticos para a migração de mais fibroblastos e a proliferação daqueles que já se encontram na ferida (BAINBRIDGE, 2013). Medrado et al., (2008) observaram o aumento da deposição de fibrina e o remodelamento do tecido conectivo em modelos de ferida cutânea cirúrgica

em ratos após irradiação com LBP na dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $9\text{mW}/\text{cm}^2$ de irradiância.

Os mecanismos descritos anteriormente acima sugerem que o aumento significativo do número de fibroblastos no 3º DAI nos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76, comparados ao CT, assim como o aumento significativo da angiogênese em FEVL53 comparado ao CT podem estar, em parte, associados com a maior quantidade de fibrina encontrada nas lesões.

A observação de que o grupo FEV também apresentou significativo aumento do infiltrado polimorfonuclear, fibrina e fibroblastos sugere que a terapia celular contribuiu para a promoção destes efeitos.

Estudos que investigaram a ação da FEV em feridas por queimadura identificaram efeito anti-inflamatório moderado, aumento da proliferação de fibroblastos e angiogênese, comparado ao grupo controle, levando a reepitelização acelerada e maior resistência do tecido cicatricial à tensão (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

O efeito anti-inflamatório observado no tratamento com FEV em diferentes estudos foi associado à atividade das CTDA na redução da síntese de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e o concomitante aumento da liberação de IL-10, que promove redução da resposta inflamatória (GONZÁLEZ et al., 2009).

Entretanto, a FEV é formada por uma coleção variada de células aptas a responder de forma diferente ao microambiente da lesão. Foi estimado que a população celular da FEV é composta por CTDA, células progenitoras endoteliais, células regulatórias T e macrófagos/monócitos regulatórios. Dentre estas, aproximadamente 6,7% são CTDA (RIORDAN et al., 2009).

O contraste entre a ação pró-inflamatória da FEV encontrada no presente estudo e a anti-inflamatória em outros, pode estar associada a diferentes perfis de populações celulares componentes da FEV utilizada. Diferentes protocolos de preparação do material podem levar à formação de condições ideais para maior desenvolvimento e atividade de alguns tipos celulares em relação a outros, particularmente de células regulatórias T (ICHIM et al., 2010).

Nos grupos que receberam FEV e LBP o balanço final entre estímulos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios pode ter resultado na prevalência de ações amplificadoras da inflamação (KIM et al., 2012).

No presente estudo, aumento significativo da reepitelização foi observado nos grupos FEVL27 e FEVL76 comparados ao CT no sétimo DAI. Diferentes trabalhos observaram o aumento da migração e proliferação de queratinócitos em feridas cutâneas após a irradiação com LBP. Reparação completa da epiderme após a irradiação precedeu a observada em controles em até 24 horas (FUSHIMI et al., 2012).

Possível papel da FEV na otimização da reepitelização em feridas por queimadura foi ressaltado por Rea et al., (2009), que observaram a aceleração do fechamento da lesão nos grupos tratados.

No presente estudo, a angiogênese no sétimo DAI foi significativamente maior em todos os grupos tratados comparados ao CT. Sugere-se que tanto a aplicação isolada de FEV quanto sua associação com LBP são capazes de aumentar a densidade de novos vasos sanguíneos formados na lesão.

Chen et al., (2008) observaram a estimulação da proliferação de células endoteliais direta e indiretamente através do aumento na expressão de VEGF pelas células musculares lisas após irradiação *in vitro* com LBP. Colombo et al., (2013) identificaram acentuada angiogênese em modelos de lesão cutânea em ratos após irradiação com LBP a 660nm, 16mW de potência e densidade de energia de 10J/cm². Análise imunohistoquímica mostrou incremento na expressão de VEGF e fator de crescimento de transformação β (TGF- β).

Aumento da vascularização após aplicação de FEV em lesões por queimadura em ratos foi observada por Atalay et al., (2014). O incremento da angiogênese foi evidenciado pela análise histológica, mostrando o aumento de estruturas vasculares tubulares e por imunohistoquímica, que exibiu aumento nos níveis de VEGF.

No sétimo DAI, também observamos aumento significativo da densidade de fibroblastos em todos os grupos tratados comparados ao CT. O grupo FEVL27 também apresentou maior quantidade de fibroblastos comparado aos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76.

Estes resultados sugerem que tanto a aplicação isolada da FEV quanto sua associação com o LBP são capazes de aumentar significativamente a migração de fibroblastos para a lesão. De particular importância, é a observação de que a associação da FEV com o LBP a 27mW de potência exibiu os melhores resultados, sugerindo a existência de um sinergismo dos dois recursos na proliferação de fibroblastos.

Irradiação por LBP promoveu aumento na expressão do gene do colágeno tipo I alpha 1 (COL1 α 1) e de VEGF em fibroblastos de camundongos irradiados *in vitro* com doses de 2 a 3J/cm². Incremento na produção de bFGF, PDGF e TGF- β também foi observado por imunohistoquímica em diversos estudos sobre reparo de feridas utilizando LBP (MARTIGNAGO et al., 2015; SAFAVI et al., 2008).

O aumento da densidade de fibroblasto em modelos animais por queimaduras tratados com FEV parece estar relacionado à maior migração destas células para o local da lesão e ao possível efeito de proteção dos fibroblastos realizado por secreção parácrina de citocinas pelas CTDA (KIM; PARK; SUNG, 2009).

Outro fator, além da secreção parácrina de CTDA, possivelmente relacionado ao aumento de fibroblastos no local da lesão, é a semelhança morfológica entre CTDA, quando inseridas no ambiente tecidual, e os fibroblastos. Preparações histológicas com H&E não permitem a diferenciação entre os dois tipos celulares, assim como não detectam possíveis fibroblastos originados diretamente da diferenciação de CTDA (HARASYMIK-KRZYŻANOWSKA et al., 2013).

Também foi observado em nosso estudo que na fase proliferativa, paralelamente ao aumento da densidade de fibroblastos, ocorreu maior produção de colágeno em todos os grupos tratados comparados aos CT. Entretanto, não observamos incremento adicional da produção de colágeno no grupo FEVL27 comparado aos grupos FEV, FEVL53 e FEVL76.

Este resultado sugere que a relação entre a presença de fibroblastos e a produção de colágeno não é linear. Outros fatores como o repertório de citocinas e fatores ativadores do fibroblasto presentes na lesão devem ser considerados, pois um grande número de fibroblastos na região da lesão em

estado quiescente não aumentaria a produção de colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Outro aspecto de particular importância na fase proliferativa é o aumento do infiltrado mononuclear, composto por populações distintas de macrófagos e linfócitos. Em nosso estudo, observamos no sétimo DAI aumento significativo de células mononucleares em todos os grupos tratados comparados ao CT.

Macrófagos classicamente ativados (M1) atuam no combate a patógenos invasores, remoção de *debris*, células necróticas e na amplificação da resposta inflamatória inicial (TREDGET; LEVI; DONELAN, 2014). Diferentes células da imunidade inata e adaptada como linfócitos TH1, células assassinas naturais (NK) e apresentadoras de antígenos (APC) são capazes de ativar macrófagos através da liberação de citocinas como interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos classicamente ativados (M1) como a IL1, IL6 e IL23 promovem o desenvolvimento e expansão de células TH17, que por sua vez, produzem IL17, citocina associada ao aumento do recrutamento de polimorfonucleares para a área de lesão (LANGRISH et al., 2005).

No presente estudo, não foi observado aumento do infiltrado polimorfonuclear no sétimo DAI, mesmo na presença de aumento significativo do infiltrado mononuclear, composto basicamente por macrófagos. Estes achados sugerem que a maior população de macrófagos encontrada nos grupos tratados pode ser composta principalmente por células ativadas de forma alternativa.

Macrófagos alternativamente ativados (M2) podem ser subdivididos em duas populações de células que apresentam papéis diferentes na manutenção da homeostasia. Os macrófagos associados ao reparo de lesões (MRL) e os macrófagos regulatórios (MR) (MOSSER; EDWARDS, 2008)

Os MRL são desenvolvidos por estímulos tanto inatos quanto adaptados, particularmente pela citocina IL4 liberada por granulócitos como mastócitos e basófilos. Sob a influência da IL4 os macrófagos aumentam a

atividade da arginase, convertendo arginina em ornitina que atua como precursora de poliaminas e colágeno, contribuindo para a produção de matriz extracelular (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os MR são caracterizados por intensa atividade anti-inflamatória mediada por IL10 e por sua participação na apresentação de antígenos às células T devido a sua elevada expressão de fatores co-estimulatórios como CD80 e CD86, entretanto, não há evidências de que estejam envolvidos na produção de componentes da matriz extracelular (MOSSER; EDWARDS, 2008).

O aumento do infiltrado mononuclear e da produção de colágeno nos grupos tratados assim como a ausência de infiltrado polimorfonuclear sugere a possibilidade de que os macrófagos residentes na lesão tenham sido alternativamente ativados, particularmente em MRL. O infiltrado polimorfonuclear se mostrou mais acentuado no grupo CT, embora sem diferença significativa, corroborando com a possibilidade de que tanto a FEV aplicada de forma isolada, ou em associação com LBP possam induzir o desenvolvimento alternativo de macrófagos, otimizando o processo de reparo tecidual.

Foi observado que o LBP com comprimento de onda de 660 nm e 15 mW de potência promove modulação da atividade mitocondrial em macrófagos não ativados e ativados por lipopolissacarídeos (LPS) e IFN γ . Tendo em vista que as mitocôndrias exercem importante papel na modulação de vias de ativação de macrófagos M1 como a do Mitogênico ativado por proteína quinase (MAPK) e do Fator Nuclear KappaB (NF- κ B), considera-se a possibilidade do LBP modificar o perfil de ativação dos macrófagos residentes na lesão (SOUZA et al., 2014).

Redução da expressão de citocinas ativadoras de macrófagos M1 como IL6, IL1 β e TNF- α foi observada após irradiação com LBP em modelos animais de artrite reumatóide, ressaltando a possibilidade de se induzir alterações na ativação das diferentes populações de macrófagos a partir de modificações no repertório de citocinas e fatores no microambiente da lesão (ALVES et al., 2013).

No sétimo DAI, também foi observado aumento significativo da necrose do colágeno no grupo FEVL53 comparado aos grupos FEV,

FEVL27 e CT. O LBP a potências de 53mW e 76mW parece influenciar de forma negativa os mecanismos de remoção do colágeno necrótico, possivelmente dos macrófagos, considerando seu papel na retirada de *debris*, células necróticas e resíduos do local da lesão (ALVES et al., 2013).

No trigésimo DAI, período característico da fase de remodelamento e maturação, nossos dados mostraram reepitelização e deposição de colágeno acentuados em todos os grupos tratados comparados ao CT. Portanto, sugere-se que a aplicação isolada de FEV ou em associação ao LBP exibiram a capacidade de modular diversos mecanismos envolvidos nessa fase da reparação tecidual.

Foi observado que a irradiação com LBP aumentou a expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2), reduzindo assim a degradação do colágeno, promoveu maior maturação na distribuição do colágeno e elevou a resistência a tensão do tecido cicatricial (MEDRADO et al., 2008).

Os grupos FEVL53 e FEVL76 apresentaram no trigésimo DAI aumento significativo do infiltrado mononuclear comparados ao CT. Independente das populações de macrófagos que possam ainda estar presentes na lesão, este evento não é característico da fase de remodelamento. Também foi observado no mesmo período que o grupo FEVL53 apresentou aumento do infiltrado polimorfonuclear comparado a todos os grupos.

Não observamos estes eventos no grupo FEV, o que sugere a possibilidade de que sejam consequências em particular da irradiação com LBP, que aparentemente estaria promovendo um prolongamento dos eventos inflamatórios característicos de fases anteriores do reparo. Respostas inflamatórias excessivamente prolongadas foram associadas com redução do grau de reepitelização, maturação do colágeno e piora da resistência à tensão do tecido cicatricial (FIÓRIO et al., 2014).

Corroborando esta análise está a observação de que a área de contração da ferida nos grupos FEVL76 e FEVL53 foi significativamente menor comparada aos demais grupos, particularmente ao grupo FEVL27 que apresentou 95% de área de contração, sendo o melhor resultado entre todos os grupos estudados, embora, sem diferença estatística significativa.

Possível razão para a redução da reepitelização e prolongamento da resposta inflamatória nos grupos FEVL53 e FEVL76 foi o emprego de potências de irradiação mais altas utilizadas no decorrer de todo o experimento. Diferentes estudos sobre a característica bifásica da curva dose-resposta em terapia por LBP sugerem que irradiâncias muito baixas ou tempos de exposição muito curtos não promoveram efeitos terapêuticos. Da mesma forma, irradiâncias muito altas ou tempos de exposição muito prolongados também não resultariam em benefícios (HUANG et al., 2011).

Irradiação com LBP de 635nm, com fluência de $5\text{J}/\text{cm}^2$ e irradiância de $4\text{mW}/\text{cm}^2$ promoveu aumento da força tênsil de tecido cicatricial em modelos de ferida cutânea em ratos. Entretanto, o efeito desapareceu quando a mesma fluência foi utilizada com irradiâncias superiores a $25\text{mW}/\text{cm}^2$ (GÁL et al., 2009). Lesões com micropipeta em culturas de fibroblastos apresentaram aceleração do processo de reparo quando irradiadas com LBP utilizando fluências entre 1,5 e $66\text{J}/\text{cm}^2$. Os melhores resultados foram encontrados utilizando doses baixas e médias (SKOPIN; MOLITOR, 2009).

A combinação ideal entre irradiância, comprimento de onda e tempo de exposição varia consideravelmente entre diferentes tecidos considerando o grau de comprometimento patológico, fase de evolução do reparo tecidual, estado oxi-redutivo celular, pigmentação da pele, presença de infecções e disponibilidade de oxigênio (HUANG et al., 2009).

7 CONCLUSÕES

Em termos macroscópicos, microscópicos e morfométricos a aplicação isolada de FEV ou em associação ao LBP nas potências de 27, 53 e 76mW promoveu melhores resultados no reparo de feridas por queimadura de terceiro grau em ratos quando comparados ao cuidado convencional.

Nos períodos iniciais do processo de reparo, fase inflamatória e começo da fase de proliferação, a aplicação do LBP associada à FEV feita com irradiâncias mais elevadas, entre 53 e 76mW/cm², promoveu maior desempenho por seus efeitos mais acentuados na promoção da angiogênese, aumento do infiltrado polimorfonuclear e migração de fibroblastos.

A partir do período intermédio da fase proliferativa até o final da fase de maturação e remodelamento, irradiâncias menores, até 27mW/cm², promoveram maiores benefícios, particularmente na migração de fibroblastos, indução da angiogênese, incremento na produção de colágeno e aceleração da reepitelização.

Isso indica que são necessários testes de protocolos de utilização de LBP associada a FEV com diferentes modelos de dose ao longo do processo de cicatrização, e que doses mais altas entre 53 e 76mW/cm² devem ser utilizadas nos períodos iniciais e, com a evolução da cicatrização, estão indicadas doses mais baixas (27mW/cm²).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in surgery and medicine**, v. 29, n. 1, February, p. 179–184, 2001.

ABRAHAMSE H. Regenerative Medicine, StemCells, and Low-Level Laser Therapy: Future Directives. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 30, n.12,p.681-682, 2012.

ASHRAF A; et al. Effect of sustained-release PDGF and TGF-beta on cyclophosphamide induced impaired wound healing. **Plastic Reconstrucion Surgery** vol. 124, p.1118–1124, 2009.

AZEVEDO AM; MACHADO MJ; CHASSOT GC. Assistência de enfermagem nos pacientes queimados com curativo aberto na unidade de internação. **Momento Perspectiva Saúde**. v.15, p. 1 – 7. 2002.

ALVES, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 5, p. R116, jan. 2013.

ATALAY, S.; CORUH, A.; DENIZ, K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 40, n. 7, p. 1375–83, nov. 2014.

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of wound care**, v. 22, n. 8, p. 407–8, 410–12, ago. 2013.

BJORDAL J.M; et al. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Australian Journal of Physiotherapy**. v. 49, 2003.

BOO, S.; DAGNINO, L. Integrins as Modulators of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dermal Fibroblasts During Skin Regeneration After Injury. **Advances in wound care**, v. 2, n. 5, p. 238–246, 2013.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S–34S, jun. 2006.

BURAVLEV, E. A. et al. Effects of low-level laser therapy on mitochondrial respiration and nitrosyl complex content. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 6, p. 1861–6, nov. 2014.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CHO KH; LEE JH; LEE SH. Effects of Human Adipose-derived Stem Cells on Cutaneous Wound Healing in Nude Mice. **Annals of Dermatology**. v.23, n. 2, 2011.

COLLAWN SS; et al. Adipose derived stromal cells accelerate wound healing in a organotypic raft culture model. **Annals of Plastic Surgery**. v.68, n.5, p.501-504, 2012.

CHEN, C.-H.; HUNG, H.-S.; HSU, S.-H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. **Lasers in surgery and medicine**, v. 40, n. 1, p. 46–54, jan. 2008.

CHUNG, H. et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.

COLOMBO, F. et al. Effect of low-level laser therapy (λ 660 nm) on angiogenesis in wound healing: A immunohistochemical study in a rodent model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, p. 308–312, 2013.

DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 301–11, jan. 2014.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 651–662, 1 mar. 2015.

DE VILLIERS J; HOURED NN; ABRAHAMSE H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using re-tinoic acid. **Stem Cell Revision**. v.7, p.869–882, 2011.

EBRAHIMI T;et al. The influence of low intensity laser therapy on bone healing. **Journal of dentistry. Tehran University of Medical Sciences**. v.9, n.4, 2012.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**, v. 6, n. 265, p. 265 - 276, 3 dez. 2014.

FERRARESI, C. DOS SANTOS, R. MARQUES G. et al. Light emitting diode therapy (LEDT) before matches prevents increase in creatine kinase with a light dose response in volleyball players. **Lasers in Medical Science**. v. 30, n. 4, p. 1281-1287, 2015.

FIÓRIO, F. B. 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, p. 313–319, 2014.

FUSHIMI, T. et al. Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 20, n. 2, p. 226–35, jan. 2012.

GÁL, P. et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 4, p. 480–8, ago. 2006.

GÁL, P. et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 4, p. 539–47, jul. 2009.

GENTILE, P. et al. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, p. 230–236, 2012.

GIANNELLI, M. et al. Photoactivation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells With Diode Laser: Effects and Mechanisms of Action. **Journal of Cell Physiology**. v. 228, p.172-181, 2013.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F.; BUNNELL, B. A. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. **Stem cell research & therapy**, v. 1, p. 19, 2010.

GIMBLE, J. M.; NUTTALL, M. E. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. **Current pharmaceutical design**, v. 17, p. 332–339, 2011.

GONZÁLEZ, M. A et al. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 1006–1019, 2009.

GOUREVITCH, D. et al. Inflammation and Its Correlates in Regenerative Wound Healing: An Alternate Perspective. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 9, p. 592-603, 2014.

GUPTA, A. et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLTL) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. **Journal of biophotonics**, v. 9999, n. 9999, 10 set. 2014.

HARASYMIAK-KRZYŻANOWSKA, I. et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. **Cellular & molecular biology letters**, v. 18, n. 4, p. 479–93, 1 dez. 2013.

HSIEH, Y.-L. et al. The fluence effects of low-level laser therapy on inflammation, fibroblast-like synoviocytes, and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 12, p. 669–77, dez. 2014.

HUANG, Y.-Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-response: a publication of International Hormesis Society**, v. 7, p. 358–383, 2009.

HUANG, Y.-Y. et al. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy - An Update. **Dose-Response**, v. 9, p. 602–618, 2011.

ICHIM, T. E. et al. Autologous stromal vascular fraction cells: A tool for facilitating tolerance in rheumatic disease. **Cellular Immunology**, v. 264, n. 1, p. 7–17, 2010.

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. Safety of Laser products. Parte 1: Equipamente classification and recommendations. 2 ed. 2007.

JAMES HP; et al. Comparative Study of the Ability of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue in Treatment of Partial Growth Arrest in Rabbit. **Tissue Engineering**. Vol. 11, n.5/6, 2005.

JAVAD TH; et al. Effect of Pulsing in Low-Level Light Therapy. **Lasers Surgery Medicine**. v.6, p.450-466, 2010.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Advances in wound care**, v. 3, n. 10, p. 647–661, 1 out. 2014.

KARIMI, H. et al. BURN WOUND HEALING WITH INJECTION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS: A MOUSE MODEL STUDY. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 27, n. March, p. 44 – 49, 2014.

KAWANO, T. et al. A comparison of midazolam and dexmedetomidine for the recovery of serotonin syndrome in rats. **Journal of anesthesia**, 18 jan. 2015.

KEARNS, R. D.; HOLMES, J. H.; CAIRNS, B. A. Burn injury: what's in a name? Labels used for burn injury classification: a review of the data from 2000-2012. **Annals of burns and fire disasters**, v. 26, n. 3, p. 115–20, 30 set. 2013.

KHOSHVAGHTI, A.; ZIBAMANZARMOFRAD, M.; BAYAT, M. Effect of low-level treatment with an 80-Hz pulsed infrared diode laser on mast-cell numbers and degranulation in a rat model of third-degree burn. **Photomedicine and laser surgery**, v. 29, n. 9, p. 597–604, 2011.

KIM, H. et al. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 68, n. 3, p. 149–156, 2012.

KIM, W.-S.; PARK, B.-S.; SUNG, J.-H. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. **Archives of dermatological research**, v. 301, n. 5, p. 329–36, jun. 2009.

KOKAI, L. E.; MARRA, K.; RUBIN, J. P. Adipose stem cells: Biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Translational Research**, v. 163, n. 4, p. 399–408, 2014.

KYRITSIS, N. et al. Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6112, p. 1353–6, 7 dez. 2012.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–40, 17 jan. 2005.

MARRA KG. Adipose derived stem cells for wound healing applications. **Annals of Plastic Surgery**. v. 66, n.2, p.210 – 215, 2011.

MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 1, p. 203–8, jan. 2015.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, nov. 2005.

MEDRADO, A. P. et al. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 92, n. 3, p. 144–52, 18 set. 2008.

MORAIS JM; et al. Anti-inflammatory effect of low intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers Medical Science** , v. 28, n.4, p. 1169-1176, jul. 2012.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. At a glance : Exploring the full spectrum of macrophage activation : Nature Reviews Imm... Page 1 of 2. **Nature Reviews Immunology**, v. 969, n. DeceMBeR, p. 2008–2009, 2008.

NATESAN S; et al. Bilayer Hydrogel With Autologous Stem Cells Derived From Debrided Human Burn Skin for Improved Skin Regeneration. **Journal of Burn Care & Research**. v. 34, n.1, p.18-29, 2013.

NG, M. F. Y. The role of mast cells in wound healing. **International wound journal**, v. 7, n. 1, p. 55–61, fev. 2010.

NIE C; et al. Locally administered adipose derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. **Cell Transplantation**. v. 20, p.205-2116, 2011.

OBARA K; et al. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photo cross link able chitosanhydrogel contain-ing fibroblast growth factor-2. **Wound Repair Regeneration**. v.13, p. 390-397, 2005.

ORON U; MALTZ L; TUBY H. Implatation of low level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infracted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.27, n.2, p. 227-234, 2008.

PECK M D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factor. **Burns**. v.37, p.1087-1100, 2011.

PINAR A et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Changes**, v. 29, n. 1, p. 997–1003, 2012.

PIVA JA; et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.5, p. 947-954, 2011.

REA, S. et al. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound--more than just inflammation. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 35, n. 3, p. 356–64, maio 2009.

RIBATTI, D. History of research on angiogenesis. **Chemical immunology and allergy**, v. 99, p. 1–14, jan. 2014.

RIORDAN, N. H. et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. **Journal of translational medicine**, v. 7, n. 29, p. 2 – 9, 2009.

RYU HH;et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Science**. v.4, p.273-284, 2009.

SAFAVI, S. M. et al. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers in medical science**, v. 23, n. 3, p. 331–5, jul. 2008.

SKOPIN, M. D.; MOLITOR, S. C. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 25, n. 2, p. 75–80, abr. 2009.

SMOOT, B. et al. Effect of low-level laser therapy on pain and swelling in women with breast cancer-related lymphedema: a systematic review and meta-analysis. **Journal of cancer survivorship : research and practice**, 29 nov. 2014.

SOUZA, N. H. C. et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Brazilian journal of physical therapy**, v. 18, n. 4, p. 308–14, jan. 2014.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American journal of surgery**, v. 176, n. 2A Suppl, p. 26S–38S, ago. 1998.

TABIT, C. J. et al. Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: Distinguishing indications, techniques, and outcomes. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 36, p. 704–713, 2012.

TREDGET, E. E.; LEVI, B.; DONELAN, M. B. Biology and principles of scar management and burn reconstruction. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, p. 793–815, 2014.

TORRES FC;et al. Stem Cells from the Fat Tissue of Rabbits: An Easy-To-Find Experimental Source. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 31, p.574-578, 2007.

TSENG WENDY. et al. Induction of Vertebrate Regeneration by a Transient Sodium Current. **The Journal of Neuroscience**. v. 30, p.1192-1200, 2010.

VALE, E. C. S. DO. Inicial management of burns : approach by dermatologists. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 9–19, 2005.

VANDER VEER WM. Cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. **Burns**. v.35, n.1, p.15 – 29, 2009.

WADA, K. et al. Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 11, p. 1785–92, set. 2006.

WARNER, P. M.; COFFEE, T. L.; YOWLER, C. J. Outpatient burn management. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, n. 4, p. 879–892, 2014.

WOLF, S. E.; TOMPKINS, R. G.; HERNDON, D. N. On the horizon: Research priorities in burns for the next decade. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, p. 917–930, 2014.

XUAN, W. et al. Transcranial Low-Level Laser Therapy Improves Neurological Performance in Traumatic Brain Injury in Mice: Effect of Treatment Repetition Regimen. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

YOO G; LIM SJ. Effects on adipose derived stromal cells and of their extract in wound healing mouse model. **Journal of Korean Medical Science**. v. 25, p. 746 – 751, 2010.

Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 04 de novembro de 2013.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA
PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 035/13**

I. IDENTIFICAÇÃO:


1. **Título do projeto:** Efeitos da ação bioestimulatória do Laser de baixa potência associada à aplicação de fração estromal autóloga contendo células tronco adiposo derivadas no tratamento de feridas por queimadura em ratos
2. **Pesquisador Responsável:** Maria Márcia Bachion
3. **Unidade/Órgão:** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Maria Márcia Bachion, Ruy de Souza Lino Júnior, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Alexandre Lamaro Cardoso, Vânia Beatriz Lopes Moura.
5. **Unidade onde será realizado:** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 14/05/2013
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 16/10/2013

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08. Reiteramos a importância deste Parecer Consustanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/01/2015.

III - Data da reunião: 04/11/2013


Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Proj. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

