

**UNIVERSIDADE BRASIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
CAMPUS ITAQUERA**

**FRANCISCO EUGÊNIO DEUSDARÁ DE ALEXANDRIA**

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS.**

**EFFECTS OF PHOTOBIMODULATION ASSOCIATED OR NOT WITH HETEROLOGOUS FIBRIN BIOPOLYMER ON THE TISSUE REPAIR PROCESS OF SKIN LESIONS IN DIABETIC RATS.**

São Paulo

2021

FRANCISCO EUGÊNIO DEUSDARÁ DE ALEXANDRIA

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Profa. Dra. Carla Roberta Tim  
**Orientadora**

Prof. Dra Livia Assis  
**Coorientadora**

São Paulo

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

A371e ALEXANDRIA, Francisco Eugênio Deusdará de

Efeitos da fotobiomodulação associada ou não ao Biopolímero de Fibrina Heterólogo no processo de reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos / Francisco Eugênio Deusdará de Alexandria. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

68 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

Coorientação: Profa. Dra. Lívia Assis.

1. Diabetes mellitus. 2. Feridas. 3. Biopolímero de fibrina heterólogo. I. Tim, Carla Roberta. II. Assis, Lívia. III. Título.

CDD 620.82



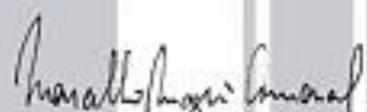
## TERMO DE APROVAÇÃO

**FRANCISCO EUGÊNIO DEUSDARÁ DE ALEXANDRIA**

**"EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS"**.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil**, pela seguinte banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a) Carla Roberta Tim (presidente-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a) Marcelo Magri Amaral (UNIVERSIDADE BRASIL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a) José Carlos Cogo (UNIVERSIDADE BRASIL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a) Hueliton Willian Kido (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Ana Laura Martins de Andrade (CENTRO UNIVERSITÁRIO NOSSA SENHORA DO PATROCÍNIO)

São Paulo, 29 de novembro de 2021.  
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim

Houve alteração do Título: sim ( ) não ( ):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



## Termo de Autorização

### Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

**Título do Trabalho: "EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS"**

**Autor(es):**

Discente: **Francisco Eugênio Deusdará de Alexandria**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Livia Assis**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Houve alteração do Título: sim ( ) não ( X ):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico essa tese, primeiramente, a Deus, a minha esposa, filhos, amigos, a minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*).

Dedico, também, de um modo muito especial a minha orientadora Profa. Dra. Carla Roberta Tim pelo incentivo, pelo comprometimento e pela forma sempre presente nesta orientação.

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho pelo apoio e contribuição para este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, pela força e pela luz que me guiou dia após dia.

A minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) por terem me ensinado valores que carrego em todos os momentos.

A minha esposa, grande incentivadora, aos filhos e aos irmãos.

A minha orientadora, a coorientadora e ao Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho pelo apoio e dedicação.

Ao Professor Figueiredo pelo trabalho nas análises histológicas.

Aos estagiários e funcionários do Núcleo de Inovação Tecnológica da UESPI que de forma direta ou indireta contribuíram com esta pesquisa.

Aos professores Rui Seabra Ferreira Jr e Benedito Barravieira pela confiança em ceder o biopolímero para a realização da pesquisa.

Aos colegas do Programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica, à Universidade Brasil e aos professores do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica.

A Unifacid que possibilitou cursar este doutorado.

Aos familiares, amigos e estudantes que sempre nos incentivaram.

A conquista é nossa!

**“NAS GRANDES BATALHAS DA VIDA, O PRIMEIRO PASSO PARA A VITÓRIA É  
O DESEJO DE VENCER”**

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Diabetes mellitus é um termo heterogêneo geral que classifica os distúrbios metabólicos ocasionados pelo aumento dos níveis de glicose (hiperglicemia). Dentre as modalidades terapêuticas pesquisadas com intuito de acelerar o reparo tecidual, destaca-se a terapia por fotobiomodulação a LED e o biopolímero de fibrina heterólogo. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da terapia por fotobiomodulação a LED associada ou não ao biopolímero de fibrina heterólogo no processo de reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos. **METODOLOGIA:** Foram utilizadas 48 fêmeas, adultas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 60 dias de idade, pesando  $230 \pm 20$  g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Piauí. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos distintos (grupo controle, grupo biopolímero de fibrina heterólogo, grupo terapia por fotobiomodulação a LED, grupo terapia por fotobiomodulação a LED associado ao biopolímero de fibrina heterólogo), os quais foram tratados em dois períodos experimentais (7 e 14 dias). A diabetes foi induzida a partir da administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% e os animais tiveram a glicemia avaliada por meio do glicosímetro e sintomas clínicos. Os animais foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos, nas regiões dorsal e cervical, a primeira por meio de um *punch* cutâneo, área de 2 cm<sup>2</sup>; e a segunda uma lesão linear de 3 cm, na região cervical. A análise da cicatrização decorreu a partir do cálculo da contração da área da ferida e pela avaliação da força de tração. **RESULTADOS:** Os tratamentos terapia por fotobiomodulação a LED e biopolímero de fibrina heterólogo, utilizados de forma isolados ou em associação, indicaram a estimulação do processo de reparo. O grupo biopolímero de fibrina heterólogo apresentou resultados similares ao grupo terapia por fotobiomodulação a LED na regressão das feridas, mas apresentaram melhor resistência cicatricial, sugerindo que o grupo LED apresenta ambas qualidades de reparo. O grupo terapia por fotobiomodulação a LED associado ao biopolímero de fibrina heterólogo mostrou melhor resultado na resistência e na regressão quando comparado aos grupos biopolímero de fibrina heterólogo e terapia por fotobiomodulação a LED, aproximando-se, estatisticamente, mais ao grupo controle. **CONCLUSÃO:** Diante dos achados foi observado que os tratamentos com LED, BFH ou LED associado ao BFH atuaram de forma satisfatória favorecendo a melhora no processo de reparo tecidual, sugerindo que estes tratamentos, isolados ou associados, foram eficazes em estimular o processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus. Feridas. Biopolímero de fibrina heterólogo. Terapia por Fotobiomodulação. LED.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Diabetes mellitus is a general heterogeneous term that classifies metabolic disorders caused by increased glucose levels (hyperglycemia). Among the therapeutic modalities researched in order to accelerate tissue repair, LED photobiomodulation therapy and heterologous fibrin biopolymer stand out. **PURPOSE:** To evaluate the effects of LED photobiomodulation therapy associated or not with heterologous fibrin biopolymer in the tissue repair process of skin lesions in diabetic rats. **METHODOLOGY:** Forty-eight adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), 60 days old, weighing  $230\pm 20$  g, from the vivarium of the State University of Piauí, were used. The animals were randomly divided into 4 distinct groups (control group, heterologous fibrin biopolymer group, LED photobiomodulation therapy group, LED photobiomodulation therapy group associated with heterologous fibrin biopolymer), which were treated in two experimental periods (7 and 14 days). Diabetes was induced by the administration of an aqueous solution of 2% alloxan and the animals had their blood glucose assessed using a glucometer and clinical symptoms. The animals underwent two surgical procedures, in the dorsal and cervical regions, the first by means of a skin punch, an area of 2 cm<sup>2</sup>; and the second a linear lesion measuring 3 cm, in the cervical region. Healing analysis was performed by calculating the contraction of the wound area and evaluating the traction force. **RESULTS:** The treatments with LED photobiomodulation therapy and heterologous fibrin biopolymer, used alone or in combination, indicated the stimulation of the repair process. The heterologous fibrin biopolymer group showed similar results to the LED photobiomodulation therapy group in wound regression, but showed better healing resistance, suggesting that the LED group has both repair qualities. The LED photobiomodulation therapy group associated with heterologous fibrin biopolymer showed better results in resistance and regression when compared to the heterologous fibrin biopolymer and LED photobiomodulation therapy groups, statistically closer to the control group. **CONCLUSION:** Based on the findings, it was observed that treatments with LED, BFH or LED associated with BFH acted satisfactorily, favoring the improvement in the tissue repair process, suggesting that these treatments, isolated or associated, were effective in stimulating the healing process in diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes mellitus. Wounds. Heterologous fibrin biopolymer. Photobiomodulation therapy. LED.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

A pesquisa em questão teve como objetivo geral avaliar o efeito do biopolímero de fibrina heterólogo e terapia de fotobiomodulação a LED, no reparo de feridas cutâneas em ratos diabéticos. Nos testes realizados observou-se que os tratamentos com LED, BFH e LED associado ao BFH atuaram de forma efetiva favorecendo a melhora no processo de reparo tecidual, indicando que estes tratamentos, isolados ou associados, foram eficazes em estimular o processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos. Assim, conclui-se que é positiva e recomendada a utilização do LED e do BFH como importantes ferramentas terapêuticas para o auxílio do processo de reparo tecidual no diabetes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da indução das feridas no dorso do animal .....	36
Figura 2 – Esquema representativo da aplicação da terapia de fotobiomodulação a LED .....	37
Figura 3 - Biopolímero de Fibrina Heterólogo: Cloreto de cálcio, trombina e crioprecipitado.....	38
Figura 4 – Imagem do programa Image Pro Plus na identificação e determinação do percentual da área de colágeno em lâminas coradas pelo picrossírius.....	42
Figura 5 – Avaliação da força de tração.....	43
Figura 6 – Análise macroscópica da ferida nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 0, 7 e 14 de experimento.....	46
Figura 7 – Índice de reparo de feridas nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 7 e 14 de experimento.....	47
Figura 8 – Fotomicrografias representativas da análise histológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH no dia 7 de experimento.....	49
Figura 9 – Fotomicrografias representativas da análise histológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH no dia 14 de experimento.....	50
Figura 10 – Classificação histopatológica nos grupos controle , LED, BFH e LED associado ao BFH aos 7 dias de experimento.....	51
Figura 11 – Classificação histopatológica nos grupos controle, LED, BFH e	

LED associado ao BFH aos 14 dias de experimento.....	52
Figura 12 – Registro do percentual da área de colágeno tipo III e tipo I com 7 dias de tratamento com BFH, LED e BFH associado ao LED em A e C com 14 dias de tratamento em B e D.....	53
Figura 13 – Teste de resistência e força de tração nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 7 e 14 de experimento.....	54
Figura 14 – Imunohistoquímica para CD34, 7 dias de evolução.....	55
Figura 15 – Imunohistoquímica para CD34, 14 dias de evolução.....	56
Figura 16 – Registro do número de vasos após 7 e 14 dias de tratamento com BFH, LED e BFH associado ao LED.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de aplicação da terapia por fotobiomodulação a LED.....	37
Tabela 2 – Parâmetros para a avaliação histológica semiquantitativa da cicatrização de feridas .....	40
Tabela 3 – Teste de glicemia.....	45

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

LED	<i>Light Emitting Diode</i> ; Diodo Emissor de Luz
ATP	Adenosina trifosfato
CEVAP	Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos
TIMPS	Inibidores Teciduais da Metaloproteinases
CEUA	Comitê de Ética para o uso de Animais
EROS	Espécies reativas de oxigênio
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
GC	Grupo controle
BFH	Biopolímero de fibrina heterólogo
FCs	Fatores de crescimento
FMT	Força máxima de tração
IL-1	Interleucina 1
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGF- $\beta$	Fator de crescimento de transformação Beta
PDGF	Fator de crescimento derivado de fibroblastos
DM	Diabetes mellitus
FBM	Fotobiomodulação
MEC	Matriz extracelular
PMN	Polimofonucleares

COX	Ciclooxigenase
VEGF	Fatores de crescimento endotelial vascular
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
CTMs	Células-tronco mesenquimais
ADA	Associação Americana de Diabetes
IP	Intraperitoneal
MMPs	Metaloproteinases
HE	Hematoxilina e Eosina
PSR	Picrosírius Red
IMaC	Índice de Maturação do Colágeno

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
3.1 PELE.....	22
3.2 FERIDAS CUTÂNEAS.....	23
3.3 FASES DE PROCESSOS DE REPARO TECIDUAL.....	25
3.4 DIABETES MELLITUS.....	27
3.5 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO.....	29
3.6 BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO.....	31
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	34
4.2 ANIMAIS.....	34
4.3 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES.....	34
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	35
4.5 TRATAMENTO.....	37
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	38
4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	39
4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DAS FERIDAS.....	39
4.9 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	40
4.10 ANÁLISE DO COLÁGENO.....	41
4.11 ANÁLISE DA FORÇA DE TRAÇÃO.....	42
4.12 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	43
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
5.1 TESTE DE GLICEMIA.....	45
5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	46
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DAS FERIDAS.....	47

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....	48
5.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	51
5.6 ANÁLISE DO COLÁGENO.....	52
5.7 ANÁLISE DA FORÇA DE TRAÇÃO.....	53
5.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	54
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A - CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA CEUA .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um grave problema de saúde pública que atinge, no Brasil, cerca de 14,3 milhões de indivíduos, sendo estimado que 23,2 milhões de pessoas apresentarão sinais e sintomas relacionados ao DM até 2040 (LIMA *et al.*, 2018). DM é um termo heterogêneo geral que classifica os distúrbios metabólicos ocasionados pelo aumento dos níveis de glicose (hiperglicemia), oriundo das alterações da secreção e/ou ação da insulina sobre organismo humano. A principal particularidade do DM está associada à dificuldade de reparo das feridas, o qual retarda a proliferação celular, a produção de fibras colágenas e a formação do tecido de granulação (DE PAULA GOMES *et al.*, 2014; SALAZAR, ENNIS e KOH, 2016; MOSTAFAVINIA *et al.*, 2016).

As feridas cutâneas são complicações comuns em pacientes com DM, ocasionadas pela interrupção da continuidade do tecido cutâneo em maior ou em menor extensão, causada por traumas físicos, químicos ou mecânicos (SALAZAR, ENNIS e KOH, 2016). A busca constante por alternativas que reduzam os custos com as lesões cutâneas tem-se mostrado uma opção para equilibrar os gastos com a saúde. Buscar tratamentos que possam diminuir os custos, como também restabelecer a integridade da pele dos pacientes vislumbra uma alternativa no processo oneroso dos sistemas de saúde (SILVA, *et al.*, 2017).

Dentre as alternativas de tratamento a fotobiomodulação (FBM) tem apresentado resultados positivos no tratamento de feridas crônicas, cujos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos mostraram-se capazes de alterar o comportamento celular consequentemente, favorecendo uma adaptação tecidual (MACEDO, *et al.*, 2021).

A FBM utiliza fontes de luz não ionizantes com finalidade terapêutica, dentre essas, o diodo emissor de luz, também conhecido pela sigla em inglês LED (*Light Emitting Diode*), tendo a capacidade de modular a expressão de fatores que contribuem significativamente para atenuar ou minimizar o desenvolvimento e progressão das alterações estruturais, assim como a atividade funcional. O LED vem sendo estudado há décadas, e a eficácia do tratamento é evidenciada por dois principais efeitos estimulantes: pela indução na diferenciação e

proliferação de fibroblastos e e pela síntese de colágeno do tecido tissular (TREVISAN, *et al.*, 2020; DE MORAES PRIANTI *et al.*, 2018).

A eficácia da FBM na aceleração da reparação de feridas cutâneas é amplamente conhecida. A radiação eletromagnética, coerente e não coerente, aumenta, significativamente, a neovascularização em tecido lesionado, acelerando o processo de reparo e diminuindo a área de necrose, indicando um aumento do fluxo sanguíneo em locais de lesão (FERREIRA *et al.*, 2013). Estudos experimentais trazem evidências do efeito positivo do LED sobre processos de lesões teciduais em ratos diabéticos, como apresentado por FERREIRA *et al.*, (2013). A eficácia também pode ser observada no estudo clínico realizado por MINATEL *et al.*, (2009), que utilizou o LED no tratamento de úlceras em pacientes diabéticos.

Da mesma forma, o biopolímero de fibrina heterólogo (BFH) vem demonstrando sucesso quando utilizado para estimular o processo de reparo de feridas. Ele é constituído pela junção de fibrinogênio e fator XIII à trombina, simultaneamente. A união desses fatores leva à formação de um coágulo de fibrina estável, polimerizado pela ação do fator XIII. Esse produto vem se mostrando promissor no processo de cicatrização de feridas (SCARDINO, 2019; PINTO; BASTIANETTO, 2013).

Atualmente na literatura vigente, não existem estudos que utilizem a associação entre BFH e a FBM a LED sobre o reparo de feridas diabéticas, bem como os seus possíveis efeitos isolados. Diante disso, é necessário estudar a associação entre as estratégias clínicas relevantes para acelerar o processo de reparo tecidual e os modelos experimentais em ratos vêm sendo amplamente estudados com o intuito de avaliar os efeitos dos recursos terapêuticos sobre o processo de reparo de lesões cutâneas (MOSTAFAVINIA *et al.*, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da terapia por fotobiomodulação (a LED) associada ou não ao biopolímero de fibrina heterólogo (BFH) no processo de reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar por meio da análise histológica as principais características relacionadas ao processo de reparo (presença de crosta, reepitelização, angiogênese e deposição de colágeno);

Avaliar por método macroscópico a regressão das feridas em dois tempos experimentais (7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias);

Investigar o grau de resistência cicatricial dos grupos experimentais.

Avaliar por meio de análise de imunohistoquímica a angiogênese.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PELE

A pele tem como finalidade revestir toda a superfície corporal, visto que é considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo cerca de 12% do peso corpóreo (4,5 quilos) (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011). Este órgão tem origem do folheto embrionário do ectodérmica e mesodérmica, tendo como função principal, servir como barreira contra patógenos, luz ultravioleta, produtos químicos e lesões mecânicas. A pele apresenta características funcionais próprias, tais como: impedir a perda de líquidos, manter a temperatura corpórea, absorver vitamina D (em virtude da exposição solar) e participar do processo de termorregulação (NYAME *et al.* 2014; BORENA *et al.*, 2015).

A pele é composta de duas camadas a epiderme e a derme, sendo a epiderme a camada mais externa da pele, constituída histologicamente por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, a qual pode apresentar diversas variações estruturais e funcionais em seu sítio anatômico. É constituído por queratinócitos, células dendríticas de *Merkel*, *Langherans* e melanócitos. A sua principal função é produzir queratina, proteína fibrosa maleável responsável pela impermeabilidade cutânea (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

Sabe-se que o estrato córneo (camada mais superficial da epiderme) é constituído por células desvitalizadas queratinizadas, as quais se agrupam de forma estratificada, uma sobre as outras, e, em seguida, separam-se para que ocorra a descamação. Abaixo dessa subcamada, são encontrados os seguintes estratos (granuloso, espinhoso, lúcido e basal). Na epiderme não são encontrados vasos sanguíneos, contudo, o único meio responsável pela alimentação da epiderme é através da difusão dos leitos capilares da derme. Esse método é essencial para que as células mais próximas continuem vivas, porém, à medida em que elas se dividem e são empurradas para a superfície, as mesmas não estão propícias a se alimentarem, ocasionando assim um processo denominado apoptose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

A derme é uma camada espessa constituída por tecido conjuntivo altamente vascularizada, constituída por proteínas fibrosas (colágeno e elastina)

embebidas em substância basal amorfa, propriedades viscoelásticas, que se situa entre a epiderme e a tela subcutânea, apresentando em torno de 1 mm até 4 mm de espessura, sendo composta de duas porções: a derme papilar (externa) e reticular (interna) (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011).

A derme papilar é constituída por numerosos fibroblastos e pela substância fundamental, as quais formam as papilas dérmicas que são constituídas por tecido conjuntivo frouxo, colágeno tipo III e fibras colágenas, representando cerca de 10% da espessura da pele. Já a camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, os quais são entrelaçados por fibras colágenas tipo I e fibras elásticas, contendo ainda, vasos sanguíneos, nervos e glândulas (sebáceas e sudoríparas) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). A derme é constituída por diferentes tipos de células, entre as principais, destacam-se: fibroblasto e fibrócitos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos, macrófagos teciduais e melanófagos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

A tela subcutânea também conhecida como hipoderme é formada a partir do folheto embrionário do mesoderma, sendo constituída principalmente por tecido adiposo, o qual tem como funções principais: reserva energética, isolante térmico e proteção contra choques mecânicos. O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo caracterizado pelo predomínio de células adiposas (adipócitos). Encontra-se distribuído na tela subcutânea em dois estratos distintos: o lamelar (compostos por adipócitos fusiformes e pequenos que se sobrepõem e armazenam o maior volume de gordura) e o areolar (formado por células globulares, túrgidas e superpostas, sendo seu maior eixo perpendicular à superfície da pele) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

### 3.2 FERIDAS CUTÂNEAS

A ferida pode ser definida como qualquer perda da integridade da pele, que dependendo do nível pode levar à perda da função essencial. Fisiologicamente, nas feridas superficiais o processo de reparo está sempre associado à contração da pele e crescimento das células seguido pelo fechamento e recuperação da ferida. Já nas feridas profundas o tempo de reparo pode ser maior associado ou não a presença de processos infecciosos que podem tornar mais difícil o processo de

cicatrização (NYAME *et al.*, 2014).

As feridas cutâneas podem ser agrupadas em dois tipos: aguda e crônica. As feridas agudas correspondem aquelas que apresentam sinais de recuperação em menos de 3 meses, sendo que as principais causas de lesão agudas são as incisões cirúrgicas, lacerações e abrasões. As feridas crônicas são identificadas como feridas cujo período de tratamento foi superior a três meses, sendo que as causas principais deste tipo são as doenças vasculares periféricas e as lesões por pressão (WALKER *et al.*, 2015).

REZENDE *et al.*, (2008) realizaram em seus estudos um levantamento acerca do custo para o tratamento das feridas de pé diabético, o qual constatou, analisando os valores pagos por internação pelo SUS, a média por internação foi de R\$ 633,97 ± 4.945,00, sendo o custo diário total das 109 internações foi de R\$ 69.103,03, sendo esse valor apenas para pés diabéticos, excluindo as demais lesões causadas pela DM e seus respectivos custos.

As feridas crônicas afetam cerca de 37 milhões de indivíduos em todo mundo podendo causar morbidade e mortalidade. CORTEZ *et al.*, (2019) realizaram um levantamento acerca do custo para tratamento de feridas crônicas, na qual estabeleceram, constatando o tempo médio de acompanhamento da lesão de 620 dias e com a troca diária do curativo convencional, o custo estimado total de todos os pacientes foi no valor de R\$ 101.030,58 (US\$ 26.586,94). Na modalidade de tratamento com coberturas avançadas, o tempo médio de acompanhamento foi de 151 dias, o que resultou em um custo total de R\$ 15.631,02 (US\$ 4.113,43). Para calcular esses valores, foi levantado o valor de insumos por unidade.

As coberturas e tratamentos avançados apresentam maior custo quando analisadas isoladamente, mas, considerando-se o número reduzido de trocas e as propriedades terapêuticas desse tipo de cobertura, o custo do tratamento é cerca de sete vezes menor, quando comparadas à cobertura convencional.

Além desses benefícios, os curativos com coberturas interativas permitem melhora da qualidade de vida para os pacientes, com aceleração da cicatrização e, ao mesmo tempo, retorno às atividades laborais e sociais, antes restritas pela presença da lesão (MEYER *et al.*, 2019; LÚCIO, PAULA, 2020).

Portanto é necessária a compreensão dos processos relacionados à cicatrização das feridas, assim como, as principais modalidades terapêuticas indicadas para cada fase do tratamento.

### 3.3 FASES DO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

Segundo Sun, Siprashvili e Khavari (2014); Frykberg e Banks (2015) e Borena *et al.*, (2015), o processo de reparo de feridas cutâneas pode ser dividido em três fases distintas, tais como: fase de inflamatória (hemostasia), proliferativa e remodeladora.

A hemostasia é o primeiro estágio do reparo de feridas, a qual depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, que tem como finalidade formar um coágulo por meio de uma vasoconstrição imediata, no intuito de evitar possíveis perdas exorbitantes de sangue no espaço extravascular após a agressão. O coágulo é formado por fibrina que tem como finalidade reorganizar a homeostase para que ocorra a liberação dos fatores de crescimento (FCs), interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC), além disso, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS) dentro de neutrófilos e macrófagos iniciam a via de coagulação extrínseca induzindo as plaquetas a liberarem os fatores de coagulação que atuam como suporte para a migração das células (Qi *et al.*, 2014).

Os principais constituintes celulares de uma ferida são a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos derivados de monócitos, os quais aparecem proporcionalmente a sua quantidade presente na circulação (OLIVEIRA e DIAS, 2012). Os macrófagos apresentam capacidade fagocítica de bactérias e ativa o desenvolvimento de tecido de granulação, predominantes do 3º ao 5º dia após a lesão (OLIVEIRA e DIAS, 2012). A hemostasia e a fase inflamatória ocorrem imediatamente após a lesão e duram em torno de 1 a 5 dias, as quais são acompanhadas por vasodilatação sistêmica e vasoconstrição endotelial vascular e com participação dos neutrófilos e macrófagos que agem no intuito remover os detritos da lesão para prevenir a infecção. (ZENG *et al.*, 2018).

Nesta fase destaca-se a participação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), um importante mediador inflamatório, visto que este quando depositado em grandes quantidades pode estar relacionado às doenças inflamatórias crônicas, fazendo com que as feridas evoluam para cicatrizes indesejáveis (CHILDS e MURTHY 2017). Também são sintetizadas glicoproteínas, como a cicloxigenase (COX), a qual apresenta duas isoformas: COX-1 e COX-2. Ressalta-se o papel da COX-2, a qual está associada na produção de importantes mediadores pró-

inflamatórios que atuarão sobre o processo fisiopatológico (CHILDS e MURTHY 2017).

A fase proliferativa é marcada pelo estágio de fagocitose da ferida, em virtude da reparação do tecido epitelial e conjuntivo. Nesta fase, ocorre a formação de uma matriz contendo fibrina, fibronectina e queratinócitos, que são liberados dos reservatórios de células-tronco se proliferando e diferenciado para reconstruir uma barreira epidérmica sobre a matriz, assim como a proliferação de células endoteliais incrementadas por fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) atuando sobre a angiogênese (OLCZYK *et al.*, 2014). Durante esta fase, a formação de novo vasos sanguíneos é necessária, visando suprir as demandas metabólicas das células em proliferação durante a reepitelização e granulação (OLCZYK *et al.*, 2014).

A expressão dos receptores da integrina nas células epidérmicas permite que eles interajam com uma variedade de proteínas da MEC (fibronectina e vitronectina) que são intercaladas com colágeno tipo I do estroma na margem da ferida e entrelaçadas com o coágulo de fibrina na ferida (OLCZYK *et al.*, 2014). Os fibroblastos produzem o colágeno que sustenta uma rede de capilares que mantém a base da formação do tecido de granulação, auxiliando o crescimento capilar ao redor lesão, o qual atua por um período de 5 a 14 dias (ORYAN e SAHVIEH, 2017).

O tecido de granulação é produzido após a indução da lesão (3 a 4 dias), a partir de processo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina, fibronectina e colágeno. A partir deste evento, inicia-se a fase de contração das paredes marginais da lesão, a qual é marcada pela atuação dos fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos, que tem como finalidade agir sobre a aproximação das margens da ferida, fazendo com que as fibras de colágeno se sobrepõem e se entrelaçarem no intuito de estimular o fechamento da lesão. Ao fim dessa fase, ocorre o estágio de epitelização, cujo qual é marcado pela migração de queratinócitos (células epiteliais) desde as margens da ferida (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Por fim, a fase remodeladora pode ocorrer simultaneamente 3 a 4 dias após a fase de proliferação, podendo durar de 3 semanas a 2 anos. É a fase mais importante clinicamente, em que ocorre a diminuição da atividade celular, do número de vasos sanguíneos e a perda do núcleo dos fibroblastos. O colágeno (tipo

l) é depositado para formar uma rede bem organizada sob a influência do TGF- $\beta$  e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

A angiogênese em constante mudança exige coordenação precisa de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tornando as quimiocinas extremamente importantes na cicatrização de feridas, visto que um desequilíbrio entre o ambiente da quimiocina pode retardar o processo de cicatrização da ferida, como o DM, onde há um excesso de inflamação impedindo que a ferida progrida para o estágio de proliferação, levando ao desenvolvimento de uma ferida crônica que não repara ou forma com uma cicatriz remanescente (RIDIANDRIES; TAN e BURSILL, 2018).

### 3.4 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus é um conjunto de doenças metabólicas crônicas não transmissíveis de origem multifatorial representada pela prevalência da hiperglicemia crônica decorrente das alterações da secreção de insulina e/ou incapacidade da insulina de exercer sua função fisiológica no corpo humano (CHENTLI, AZZOUG e MAHGOUN, 2015). A prevalência do DM, em geral, está crescendo em todo o mundo, e está se tornando um problema epidêmico e endêmico com a carga social e econômica, estima-se que cerca de 10,9 milhões de adultos norte-americanos com faixa etária entre 30 a 65 anos, apresentam diagnóstico de DM, ainda acredita-se que esse número deverá atingir 26,7 milhões até 2050 (BORISSOVA *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2015; KALRA *et al.*, 2015).

A classificação do DM é determinada de acordo com a sua etiologia, podendo ser categorizada em: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos. A DM tipo 1 é relacionada com a destruição das células pancreáticas beta ( $\beta$ ) com a escassez absoluta da insulina e com tendência à cetoacidose, enquanto, que o DM tipo 2, resulta na resistência a produção dos níveis de insulina e pela deficiência em sua produção pelo organismo e por fim, a DM gestacional, que é definida por uma anomalia da tolerância aos hidratos de carbono diagnosticada ou detectada pela primeira vez durante a gravidez, resultando em graus variáveis de hiperglicemia materna, podendo persistir após o parto ou ser uma condição temporária se for tratada adequadamente (PUNTHAKEE *et al.*, 2018).

Geralmente, acredita-se que no DM tipo 1 é ocasionado uma destruição

imune, diretamente mediada das células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina, embora o DM tipo 1 possa ser diagnosticado em qualquer idade, é uma das doenças crônicas mais comuns da infância entre os 5 e 7 anos de idade, sendo mais comum em indivíduos do gênero masculino. Polidipsia, polifagia e poliúria (o trio clássico de sintomas associados ao início da doença), juntamente com a hiperglicemia evidente, permanecem como marcos diagnósticos em crianças e adolescentes e, em menor grau, em adultos (WHITING *et al.*, 2011; ATKINSON; EISENBARTH e MICHELS, 2014).

DM tipo 2 consiste na resistência à insulina, que reduz a captação de glicose em tecidos insulino-dependentes e inicia-se com hiperinsulinemia compensatória, que pode persistir por meses ou anos (BENDINELLI *et al.*, 2012). O DM tipo 2, que representa 90% a 95% dos casos, ocorre predominantemente após os 40 anos de idade, visto que nesses casos, embora a hiperglicemia esteja presente, a cetoacidose raramente se desenvolve. Além do DM, a resistência à insulina tem muitas manifestações que incluem obesidade, nefropatia, hipertensão arterial, dislipidemia (hipertrigliceridemia, HDL baixo, diâmetro das partículas de LDL diminuído, lipemia pós-prandial aumentada e acúmulo de lipoproteínas remanescentes), hiperandrogenismo ovariano e adrenarca prematura, gordura não alcoólica, doença hepática e inflamação sistêmica (KHARROUBI *et al.*, 2015).

Ramos *et al.*, (2014) esclarecem em seu estudo que no DM ocorre uma dificuldade de reparo nas feridas, devido ao comprometimento do baixo fluxo sanguíneo, evitando um adequado fornecimento de oxigênio, nutrientes e antibióticos, as quais estão associadas à supressão da resposta inflamatória, tais como: diminuição na angiogênese (formação de novos vasos), alterações na migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais e defeitos na deposição de colágeno.

Lima e Araújo (2013) retratam vários mecanismos que são apontados como fatores importantes na diminuição do processo de reparo, entre eles, a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), diminuição do Óxido Nítrico (NO), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (GFs) e das proteínas da via de sinalização da insulina.

A presença da disfunção endotelial, caracterizada pela incapacidade das artérias e arteríolas em desempenhar suas funções na regulação do tônus vascular, em resposta a um estímulo apropriado, leva a um microambiente isquêmico, ou

seja, uma porção do organismo que não recebe oferta sanguínea suficiente. Esta disfunção está associada com a diminuição da biodisponibilidade do NO, pela diminuição da produção pelo endotélio e/ou aumentada inativação do NO por ROS. A excessiva produção de ROS em pacientes diabéticos é um fator primário que contribui para deficiências de cicatrização de feridas. O rompimento do equilíbrio normal das Metaloproteinases (MMPs) e dos Inibidores Teciduais da Metaloproteinases (TIMPs) também contribui para o retardo da cicatrização em diabéticos. Outra via envolvida neste processo é a da sinalização da insulina, expressa na pele intacta de animais, sendo que, com o estímulo exógeno de insulina, ocorre a ativação de proteínas. Estudo recente identificou que as proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina na ferida cutânea de animais diabéticos estão diminuídas em relação aos animais saudáveis, dificultando o reparo tecidual (LIMA e ARAÚJO, 2013).

É de suma importância considerar que diversos métodos de terapias alternativas têm sido amplamente estudados para investigar os reais efeitos sobre o processo de reparo de feridas em diabéticos, devido aos tratamentos existentes serem curativos e pouco eficazes e a necessidade de troca contínua resultar em alto custo.

### 3.5 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO

A terapia por fotobiomodulação se refere à aplicação de luz a um sistema biológico capaz de induzir um processo fotoquímico, principalmente nas mitocôndrias, com estimulação da produção de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP), o que pode aumentar o metabolismo celular e produzir efeitos como analgesia, reparo de tecidos, redução de fadiga muscular, dentre outros (BACELETE e GAMA, 2021).

As primeiras aplicações clínicas da fotobiomodulação realizadas com laser de baixa intensidade ocorreram na década de 60, sendo o médico húngaro *Endre Mester*, o descobridor do potencial fotobiológico do laser de rubi. A partir de então, a terapia por fotobiomodulação com laser, vem sendo um dos recursos terapêuticos mais utilizados na prática clínica para modular a inflamação e estimular o reparo de diferentes tecidos (PAULA, 2016). No entanto, os mecanismos de ação da terapia por fotobiomodulação ainda não são totalmente

conhecidos. Sabe-se que seu mecanismo biológico básico é descrito através da absorção de luz vermelha pelos cromóforos mitocondriais, em particular o citocromo C oxidase que atua como um fotorreceptor, contido na cadeia respiratória localizada no interior das mitocôndrias e também por fotorreceptores na membrana plasmática das células.

Resultados satisfatórios com o uso do laser na faixa espectral do vermelho ao infravermelho (600-1200nm) têm sido comprovados através de estudos experimentais e clínicos, indicando que esta terapêutica pode ter eficiente ação moduladora de inflamação e analgésica, além de aumentar a produção de adenosina trifosfato (ATP), facilitando o crescimento celular e a neovascularização e, conseqüentemente, promovendo rapidez e qualidade no processo de reparo de lesões cutâneas (SANCHEZ; ANDRADE; PARIZOTO, 2018).

Outras fontes de luz com objetivos semelhantes ao laser foram descobertas e exploradas, como o LED sigla do inglês *Light-emitting diode*. Ambas as fontes de luz (laser e LED) não são ionizantes e monocromáticas diferindo apenas na coerência, que consiste na radiação formada por ondas eletromagnéticas de mesma frequência e direção que mantêm uma relação de fase constante entre si. Estudos que investigaram a importância da coerência da luz nos efeitos terapêuticos e observaram que a coerência que difere a luz laser do LED não é o parâmetro de maior relevância, já que o LED, uma luz não coerente também tem demonstrado efeitos positivos no tratamento dos tecidos (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009)

Estudos experimentais em ratos diabéticos (DE LOURA SANTANA *et al.*, 2015; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2016; AHMED *et al.*, 2018) têm demonstrado que a FBM apresenta resultados efetivos acerca do reparo tecidual, devidos aos seus efeitos fisiológicos, tais como: a proliferação de fibroblastos (FORTUNA *et al.*, 2017), redução do processo inflamatório (PESSOA *et al.*, 2017), incremento da síntese de colágeno e reparo tecidual (DE LOURA SANTANA *et al.*, 2015; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2016; AHMED *et al.*, 2018).

A FBM atua na migração celular, viabilidade, na angiogênese e proliferação em células fibroblásticas, agindo diretamente nos danos causados pela deficiência vascular oriunda da DM, que provoca uma distribuição prejudicada de sangue para as extremidades do corpo, há uma redução da sensibilidade, carência de oxigênio, redução da formação de novos vasos (LÚCIO, PAULA, 2020).

Considerando as propriedades envolvidas no reparo dos tecidos após lesão tecidual, a FBM é um recurso de grande relevância clínica, uma vez que promove efeitos fotobiológicos efetivos sobre o reparo de feridas, no entanto, o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado pela literatura vigente é totalmente compreendida, em que acredita-se que os efeitos fisiológicos são almeçados por vias proliferativas e energéticas, transdução de sinais elétricos, bioquímicas ou atividade imunitária, que dependem de parâmetros dosimétricos (comprimento de onda, energia, tempo de irradiação, entre outros) (KARU *et al.*, 2014).

### 3.6 BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO

O biopolímero de fibrina heterólogo (BFH) foi desenvolvido em 1990 por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), no Estado de São Paulo, Brasil, objetivando se tornar um adesivo à base de fibrina sem o uso de sangue humano, impedindo a transmissão de doenças infecciosas. Após o desenvolvimento de pesquisas com o BFH, comprovou-se sua capacidade adesiva; ação coagulante, ação adjuvante no reparo ósseo, cartilaginoso como também a possibilidade de utilização como arcabouço para células-tronco mesenquimais (LIMA, 2019).

O BFH é constituído por um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos *Bubalus bubalis*, de uma enzima semelhante à trombina (serinoprotease) obtida do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* e um diluente de cloreto de cálcio. A falta de derivados do sangue humano impede a transmissão de doenças infecciosas de vírus novos ou mesmo antigos. Os benefícios descritos para o uso do biopolímero de fibrina em úlceras crônicas estão relacionados à hemostasia e à maior aderência do enxerto ao leito da úlcera. Além de sua função de aderência, o biopolímero de fibrina é um excelente arcabouço biológico. Sua característica de aderir ao leito da ferida, por pelo menos quatro dias, o torna uma excelente estrutura de liberação de fármacos para incorporação e liberação de células, fatores de crescimento e até antibióticos (ABADDE *et al.*, 2021).

O BFH é preparado a partir do concentrado de fibrinogênio, fator XIII e fibronectina com a adição da trombina e ácido tranexâmico ou aprotinina, onde os

componentes são misturados no momento da aplicação. O acréscimo de aprotinina ou ácido tranexâmico contribui para a formação do coágulo de fibrina. O fibrinogênio sendo precursor da fibrina, representa o elemento básico do coágulo. A transformação do fibrinogênio em fibrina estável ocorre a partir da ação da trombinae do fator XIII. O BFH mimetiza as etapas finais da cascata da coagulação, de maneira autônoma em relação ao mecanismo de coagulação, sendo também efetiva nos pacientes portadores de coagulopatias ou naqueles que estão fazendo uso de anticoagulantes ou heparina. O coágulo estável, reforçado pela ativação do fator XIII, o qual participa da síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos, contribuem para a cicatrização dos tecidos (OLIVEIRA, *et al.*, 2020; MONSEF *et al.*, 2014 SCARDINO *et al.*, 2019).

Os BFH vêm sendo amplamente utilizados em aplicações clínicas, na forma de adesivo biológico, em virtude das suas propriedades hemostáticas, que atua reduzindo os quadros de hemorragias. O BFH pode servir como um arcabouço apropriado, permitindo a proliferação celular sem que ocorra deformação estrutural (MONSEF *et al.*, 2014; SCARDINO *et al.*, 2019).

A aplicabilidade do BFH vem sendo estudada por meio de modelos experimentais em animais, entre as principais, destaca-se: a pele (RAHAL *et al.*, 2003), intestino (LEITE *et al.*, 2000), tendão (FERRARO *et al.*, 2005) entre outras aplicações.

Após anos de pesquisas, Lima (2019) afirma que foi constatado que o biopolímero de fibrina heterólogo atua na formação de cicatriz mostrando resultado satisfatório para a área de adesão; sem apresentar efeitos tóxicos locais ou sistêmicos. Outro ponto positivo que podemos salientar é que o biopolímero de fibrina heterólogo tem menor custo de produção sendo de fácil aplicação tornando-se viável para utilização em modelos animais.

O BFH é uma cola derivada do veneno de serpente com diversas aplicações na área da saúde. Têm propriedades hemostática, adesiva, selante, arcabouço e é amplamente utilizada em procedimentos médicos e odontológicos (COLETTA *et al.*, 2019).

Estudo utilizando o biopolímero de fibrina heterólogo mostraram resultados satisfatórios em cirurgias de enxerto de gengiva se comparado com enxertos suturados, indicando que o BFH pode representar uma alternativa eficaz e segura às suturas convencionais em procedimentos gengivais (BARBOSA *et al.*, 2007).

Vicente *et al.*, (2007) compararam a eficácia da coaptação com o BFH na reparação do nervo fibular. Ratos Wistar tiveram seu nervo seccionado e reparado imediatamente com o BFH. Os nervos que foram reparados com o BFH foram mielinizados e tiveram as fibras nervosas reparadas, demonstrando uma interrupção da hemorragia e a recuperação funcional da estrutura do nervo .

Estudos realizados com fêmeas de ratos *Lewis* demonstraram a eficiência do BFH na recuperação motora e na preservação sináptica de cirurgia reparadora de avulsão de raiz ventral, na interface do sistema nervoso central, auxiliando na neuroproteção e preservação da rede sináptica, reduzindo a reação astrogliar e aumentando os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para as neurofinas e citocininas, que podem contribuir para a melhora da função motora (*BARBIZAN et al.*,2013).

Estudos conduzidos por *latecola et al.*, (2013) constataram a capacidade osteocondutora do BFH na reparação de defeitos no crânio em ratos Wistar machos, que pode representar um recurso, aplicado nas cirurgias de reconstrução óssea.

Estudo realizado por *Ereno* (2009) aponta o uso do biopolímero como arcabouço para células-tronco mesenquimais (CTMs) em neurocirurgia, corroborando *Gasparotto et al.*, (2014) constataram que o BFH não afetou o microambiente biológico das células não havendo prejuízo na adesão celular, proliferação ou diferenciação e permitiu a aderência e o crescimento de CTMs. Tais resultados sugerem que o BFH é um polímero biocompatível e adequado carrear células-tronco em distintas situações, inclusive na engenharia de tecidos. Essa função de estrutural foi descrita com sucesso por *Orsi et. al.*, (2017), ao utilizar o BFH como arcabouço para CTMs, na regeneração óssea de ratos com osteoporose.

No momento atual o biopolímero de fibrina heterólogo tem eficácia comprovada por diversos estudos publicados em revistas científicas indicando ser um produto seguro e com eficácia promissora.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Este trabalho foi realizado em modelo *in vivo* (modelo animal). O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) e aprovado sob protocolo 0298/2019 (Anexo A). Para realização do presente projeto, foram respeitadas as premissas éticas através da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que rege os procedimentos para o uso de animais em pesquisas científicas.

### 4.2 ANIMAIS

A pesquisa foi realizada no laboratório de Fisiologia da UESPI, situado na rua Olavo Bilac, nº 2335, bairro Centro (Sul) em Teresina – Piauí. Para a realização deste estudo foram selecionados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) fêmeas, adultas (acima de 60 dias de vida), com 250 g  $\pm$  30g de massa corporal, provenientes do Biotério da UESPI. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, de polietileno, devidamente etiquetadas, os quais estiveram em temperatura ambiente controlada de 25°C e umidade do ar de 60%, fotoperíodo de 12 h claro/escuro, recebendo água e alimentação padrão *ad libitum*.

### 4.3 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES

Para indução do modelo experimental do DM, foram realizadas buscas sobre metodologias que utilizassem aloxana com a finalidade de induzir a patologia e que obtinham resultados positivos, além de baixo índice de mortalidade. Após algumas tentativas, encontrou-se maior sucesso no método desenvolvido por Gonçalves (2018) utilizando animais fêmeas.

Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas, visto que estas condições favorecem o desenvolvimento da patologia. Foi injetado, por via intraperitoneal, nos animais uma dose única, calculada a 60 mg/kg de peso corporal, de solução aquosa de aloxana a 2% (Aloxan-Sigma St. Louis USA), uma droga conhecida por destruir as células beta-pancreáticas, causando alterações na homeostase glicêmica.

Para confirmação do aumento da glicemia, os animais foram submetidos a glicosimetria, mediante investigação pelo instrumento *Accu check active* (Roche, Suíça), os quais foram considerados diabéticos aqueles que apresentarem glicemia no valor de 200 mg/dL ou superior, valor estabelecido pela Associação Americana de Diabetes (ADA), após o sétimo dia da indução experimental.

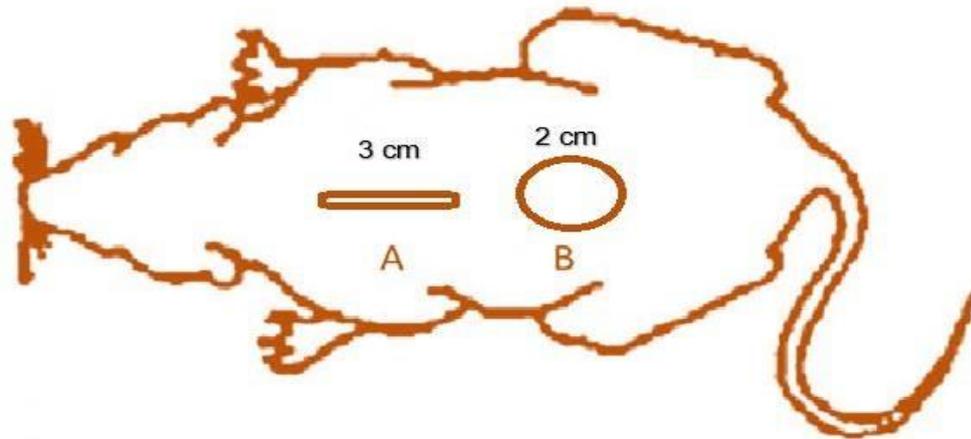
#### 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A partir da apresentação dos sintomas clínicos e glicemia elevada, os animais, após a pesagem, foram anestesiados com injeção intramuscular (IM) de cloridrato de ketamina, na dose de 60-80 mg/kg, e cloridrato de xilazina, na dose de 1,6-2,0 mg/kg, conforme normas e diretrizes éticas para pesquisa com animais da Resolução 879 de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Após a tricotomia da região dorsal os ratos foram posicionados em decúbito ventral, foi realizada assepsia com álcool a 70% para a realização de duas feridas, uma longitudinal e outra circular, em cada animal. Para as lesões, foi demarcado o dorso dos animais, abaixo das escápulas, e realizada uma lesão linear de 3 cm, em seguida as bordas foram aproximadas com 3 pontos de sutura (figura 1 A). Esta lesão teve a finalidade de avaliar a qualidade da cicatrização por meio da análise de força de tração (item 4.9). Posteriormente, no mesmo ato cirúrgico, foi realizada a segunda lesão com um *punch* dermatológico, com um diâmetro de 2 cm atingindo todas as camadas da pele e removendo-as (figura 1B). A hemostasia foi feita por compressão digital, utilizando-se gazes esterilizadas.

Nos primeiros três dias de pós-operatório, foi administrado, como medicação analgésica, paracetamol 200 mg/ml de 8 em 8 horas. Os animais foram monitorados diariamente pelo pesquisador. A higienização das caixas, manutenção da alimentação e troca da água, foram realizadas regularmente por profissional habilitado.

**Figura 1:** Representação da indução das feridas no dorso do animal.



Legenda: A: indução da ferida longitudinal B: indução da ferida circular.

Fonte: autor

Os animais (todos diabéticos) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos distintos (grupo controle, grupo biopolímero de fibrina heterólogo, grupo terapia por fotobiomodulação a LED, grupo terapia por fotobiomodulação a LED associado ao biopolímero de fibrina heterólogo) com 12 animais por grupos, os quais foram avaliados em dois períodos experimentais, 7 e 14 dias após o início do tratamento. Abaixo estão descritos os grupos experimentais que foram estudados:

**Grupo Controle (GC):** animais diabéticos com feridas os quais não receberam nenhum tipo de intervenção;

**Grupo Biopolímero de fibrina heterólogo (BFH):** animais diabéticos com feridas tratados com BFH;

**Grupo terapia por fotobiomodulação a LED (LED):** animais diabéticos com feridas tratados com a terapia por fotobiomodulação a LED.

**Grupo Terapia por fotobiomodulação a LED associado ao biopolímero de fibrina heterólogo (LED + BFH):** animais diabéticos com feridas tratados com associação da terapia por fotobiomodulação a LED e do BFH.

#### 4.5 TRATAMENTO

O tratamento com as terapias isoladas (LED e BFH) e associadas (LED + BFH) de cada animal teve início 1 hora após procedimento cirúrgico, a partir disso, ocorreu a cada 72h, até o fim do período, sendo 7 ou 14 dias.

O LED era aplicado em um angulo reto durante 60 segundos, a uma distância de 1cm da ferida, cujo feixe atinge a área de 2cm<sup>2</sup>. Era aplicado antes do BFH, quando associados.

A terapia por fotobiomodulação a LED (figura 2) foi realizada utilizando o equipamento LED Tendlite® medicinal, modelo 204 nos parâmetros descritos conforme especificação do fabricante na tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros de aplicação da terapia por fotobiomodulação a LED.

<b>COMPRIMENTO DE ONDA</b>	660 nm
<b>POTÊNCIA DE SAÍDA</b>	0,166 W
<b>DIAMETRO DA PONTA</b>	2,54cm
<b>TEMPO DE IRRADIAÇÃO</b>	60 segundos
<b>ENERGIA</b>	9,96 J
<b>ÁREA DE FEIXE</b>	2 cm <sup>2</sup>
<b>TÉCNICA DE APLICAÇÃO</b>	Pontual a distância de 1 cm
<b>NÚMERO DE PONTOS</b>	1
<b>FREQUÊNCIA DE APLICAÇÃO</b>	A cada 72 horas

Fonte: autor

**Figura 2:** Esquema representativo da aplicação da terapia de fotobiomodulação a LED

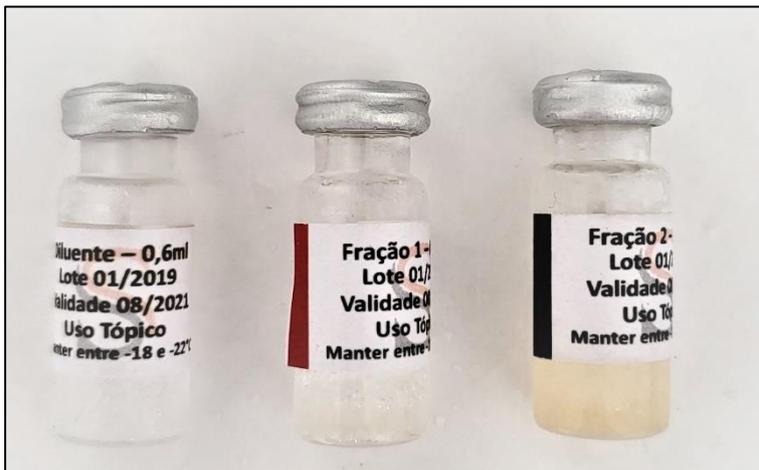


Fonte: autor

O Biopolímero de Fibrina Heterólogo foi fornecido pelo CEVAP- Centro de Estudos de Animais Peçonhentos, da Universidade Estadual de São Paulo- UNESP, Botucatu, constando de três frascos ( figura 3): Frasco diluente contendo 0,6mL de cloreto de cálcio, frasco da fração 1 ( tarja vermelha) contendo 0,4 mL da enzima semelhante à trombina e o frasco da fração 2 ( tarja preta) com 1 mL de crioprecipitado. A aplicação do biopolímero foi realizada de forma tópica nas feridas dos grupos BFH e LED + BFH, utilizando 2 seringas de 1 mL, uma contendo a mistura do frasco 1 e do frasco diluente e a segunda seringa, contendo 1ml da fração 2. Foram aplicados 2 g do biopolímero de fibrina heterólogo na área lesionada e espalhado com auxílio de uma espátula de forma que toda a área ficasse recoberta.

O procedimento aconteceu a cada 72 h a partir do procedimento cirúrgico, sendo o BFH realizado após a aplicação do LED quando associados.

**Figura 3** - Biopolímero de Fibrina Heterólogo: Cloreto de cálcio, trombina e crioprecipitado.



Fonte: autor

#### 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos pré-estabelecidos 7 e 14 dias, por meio de sobredose do anestésico tiopental sódico (100mg/kg), por via intraperitoneal (IP).

A coleta das amostras de pele incluiu toda a extensão das feridas, com margem de 1 cm de pele íntegra. A margem atua como referência de tecido

saudável para que possa ser localizado o ponto de lesão a ser analisado.

As amostras da ferida circular foram destinadas as análises histológicas. Para isso, foram fixadas em solução tamponada de formalina a 10 % durante 24 horas. E encaminhadas para o processamento histológico convencional, constando de desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura, e submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e que permite a visualização das fibras colágenas na cor rosa, sendo essa a mais comum e rotineira, e, para análise mais específica, e o Picrosirius Red, que cora o colágeno de rosa a vermelho. Todas as lâminas foram codificadas de modo que o examinador não possuía conhecimento sobre a qual grupo pertencia.

As amostras da ferida longitudinal foram destinadas ao teste de força de tração da cicatriz, elas foram retiradas e irrigadas com solução fisiológica a 0,9 % e logo em seguida foram submetidas ao teste força de tração.

#### 4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise macroscópica da ferida foi realizada diariamente onde foi investigada a região da lesão quanto às seguintes ocorrências: necrose, inflamação local, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade.

#### 4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A análise morfométrica foi realizada seguindo o procedimento descrito por Moura *et al.*, (2020), através de registros fotográficos no dia 0 e no dia de eutanásia do animal (7 e 14 dias). Foi utilizada uma câmera digital no modo básico, sem flash, sem zoom. Para a padronização da distância da câmera à ferida utilizou um suporte de alumínio a 20 cm e perpendicular à ferida. Uma régua disposta ao lado dos animais e junto à ferida foi utilizada para a padronização da unidade de área das lesões em mm. As imagens foram analisadas pelo software Image J 1,45 (*Research Services Branch, Nacional Institutes of Health – NIH (Bethesda, Maryland, EUA)*). Depois de determinar a área da ferida, o seguinte cálculo foi

aplicado:  $\text{área inicial( dia 1) - a área final( dia 7 ou dia 14 ) / área inicial} \times 100$ , determinando, assim, o percentual de regressão ( Moura *et al.*, 2020)

#### 4.9 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Após eutanásia dos animais as feridas foram removidas com margem de pele íntegra e fixadas em solução tamponada de formalina a 10% durante 24 horas. Duas a três amostras transversais centradas na ferida foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina. (H.E.) para análise histológica convencional e pelo Picrosírius Red (PSR) para análise das fibras de colágeno. As preparações histológicas foram examinadas em um microscópio óptico trinocular (Olympus® CX31, Japão), equipado com uma câmera digital (Bell & Howell, EU 16.0 Plus, U.S.A.) acoplada a um microcomputador. Os aspectos histológicos foram transformados em variáveis semi-quantitativas, mediante atribuição índices de intensidade (Lee *et al.*, 2012) conforme demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2.** – Parâmetros para a avaliação histológica semiquantitativa da cicatrização de feridas.

Aspectos histológicos	Escala de Intensidade			
	Ausente	Discreta	Moderada	Intensa
Reepitelização	0	1	2	3
Infiltração de polimorfonucleares	0	1	2	3
Infiltração de mononucleares	0	1	2	3
Proliferação fibroblástica	0	1	2	3

Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, 2012.

**Reepitelização** – Foi classificada como ausente (0), quando não se visualizava epitélio neoformado nas margens da ferida; discreta (1), quando o epitélio neoformado cobria até 25% da superfície da ferida; moderada (2), quando o epitélio neoformado cobria até 75% da superfície da ferida; e acentuada (3), quando o epitélio neoformado cobria até totalmente superfície da ferida e mostrava ceratinização superficial.

**Infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares** – Basicamente uma indicação de inflamação aguda e formada por neutrófilos, foi classificada como ausente (0), quando tais células não eram visualizadas; discreta (1), quando os neutrófilos estavam presentes em pequeno número e dispersos na matriz extracelular (MEC); moderada (2), quando encontrados em número maior ou condensados em focos; e acentuada (3), quando encontrados em número muito elevado, distribuindo-se difusamente na MEC.

**Infiltração de células inflamatórias mononucleares** – Composta predominantemente por macrófagos e uma indicação de inflamação crônica, foi considerada como ausente (0), quando não eram visualizadas; discreta (1), quando presentes em número reduzido; moderada (2), quando identificadas em maior número ou em focos; e acentuada (3), quando visualizadas em número elevado, distribuindo-se difusamente na MEC.

**Proliferação fibroblástica** – Foi classificada em ausente (0), quando os fibroblastos não eram identificados na MEC, em geral muito edemaciada; discreta (1), quando os fibroblastos estavam presentes em número reduzido e dispersos na MEC; moderada (2), quando identificadas em maior número e dispostos em feixes; e acentuada (3), quando fibroblastos eram visualizados em número elevado, em geral arranjado em feixes dispostos em diferentes direções.

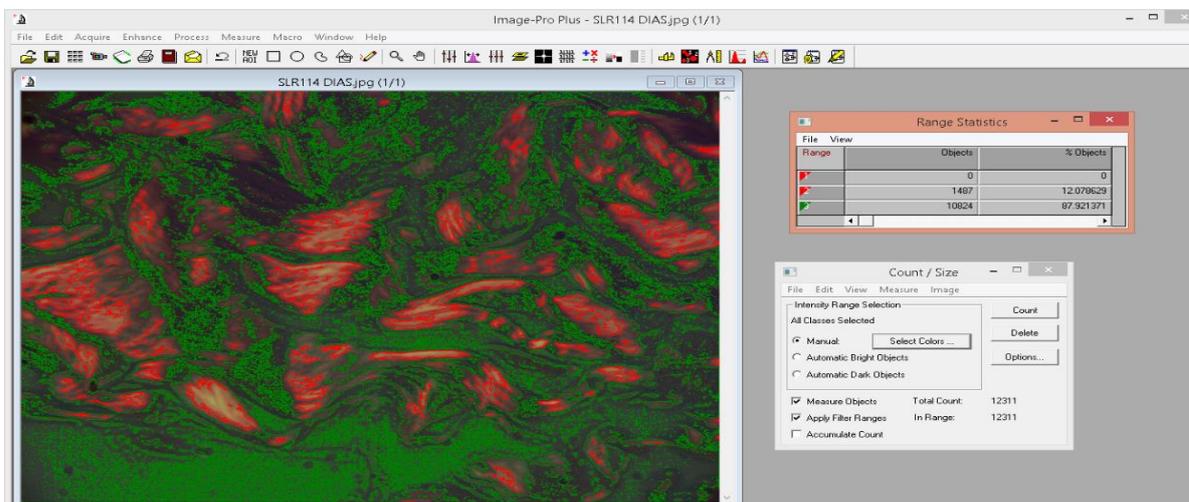
#### 4.10 ANÁLISE DO COLÁGENO

Depois da microtomia, os cortes histológicos foram submetidos à coloração pelo picrossírius red. Para identificação de colágenos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), analisaram-se os cortes histológicos por meio de microscópio óptico, em aumento de 400 vezes, com fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmera e transmitidas a monitor colorido, congeladas e digitalizadas por meio de placas. Finalmente, foi realizada a análise das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows (Mídia Cibernética, São Paulo, SP).

No sistema RGB (Red, Green, Blue) foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo

III). Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo. Nos cortes histológicos foram realizadas a aquisição de 4 campos microscópico sobre a área da lesão onde foram obtidas medidas das áreas distintas. Em cada uma delas o “software” calculou a percentagem da área ocupada pelas fibras que continha colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada( Moura *et al.*, 2020)

**Figura 4** Imagem do programa Image Pro Plus na identificação e determinação do percentual da área de colágeno em lâminas coradas pelo picrossírius.



Fonte: autor

A partir da medida da percentagem de fibras colágenas foi calculado o índice de maturação de colágeno (IMaC) foi realizado, segundo descrito por Simões *et al.*, (2019), sendo obtido por meio da razão percentual de colágeno tipo I pelo percentual de colágeno tipo III, onde valores maiores do que 1 indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno do tipo III.

#### 4.11 ANÁLISE DA FORÇA DE TRAÇÃO

A avaliação da força de tração seguiu o procedimento descrito por Moura *et al.*, (2020). A resistência da cicatriz cutânea foi medida retirando-se o reparo cutâneo da região cervical de 4 x 2 cm com a cicatriz em sua parte média após o período de tratamento. Foi utilizada uma máquina universal de ensaio mecânico com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados

(dinamômetro). As extremidades do fragmento de pele, que contém a sutura em sua porção média, foram fixadas às presilhas, com ajuste manual, como mostrado na figura 5. A tração ocorreu com velocidade constante, usando-se carga de 10 kg, com sensibilidade de 50 g, até a ruptura total do corpo de prova. A força de tração foi constantemente mensurada por meio de um computador anexo ao sistema de presilhas, considerando-se como variável a força máxima de tração (FMT) em kgf.

**Figura 5:** Avaliação da força de tração.



Fonte: autor

#### 4.12 IMUNOHISTOQUÍMICA

Seções de 5  $\mu\text{m}$  de espessura obtidas dos blocos de parafina preparados para estudo histológico convencional foram montadas em lâminas SuperFrost™, desparafinizadas e submetidas à coloração imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-CD34 (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, EUA) para identificação de células endoteliais de vasos sanguíneos. O preparo das amostras foi feito de forma automática no processador BenchMark Ultra IHC/ISH (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Para a contagem dos vasos sanguíneos, oito áreas distintas de cada lâmina submetida à coloração imunohistoquímica, cobrindo todo o leito da ferida, foram digitalizadas no

aumento de 100x, usando-se o mesmo microscópio e câmera descritos acima. As imagens foram abertas com o programa Image J® e os vasos com células positivas para anti-CD34 foram contados manualmente usando o Plugin Cell Count

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística, utilizou o programa estatístico GraphPad Prism® (versão 5.0, InStat Software Inc., La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) e a Homogeniedade com o teste de Levene. Os dados foram avaliados e analisados por meio da análise de variância one-way (ANOVA), seguido de teste de Tukey, com significância  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTE DE GLICEMIA

A confirmação de indução de diabetes mellitus nos animais foi realizada pelos níveis de glicose no sangue.

Cerca de 60% dos animais apresentaram os quesitos necessários para serem classificados diabéticos 7 dias após a indução, 15% desenvolveram após 14 dias, 10 % desenvolveram em 7 dias mediante segunda dose, 10% não chegaram a desenvolver e 5% evoluíram a óbito após indução.

A tabela 3 demonstra que antes da aplicação de aloxana 2% todos os animais apresentaram índice de glicose normal, abaixo de 90 (mg/dl). Após 7 dias da aplicação de aloxana 2%, apresentaram índice de glicose acima de 220 (mg/dl), o que caracteriza a indução do diabetes mellitus.

**Tabela 3:** Teste de glicemia.

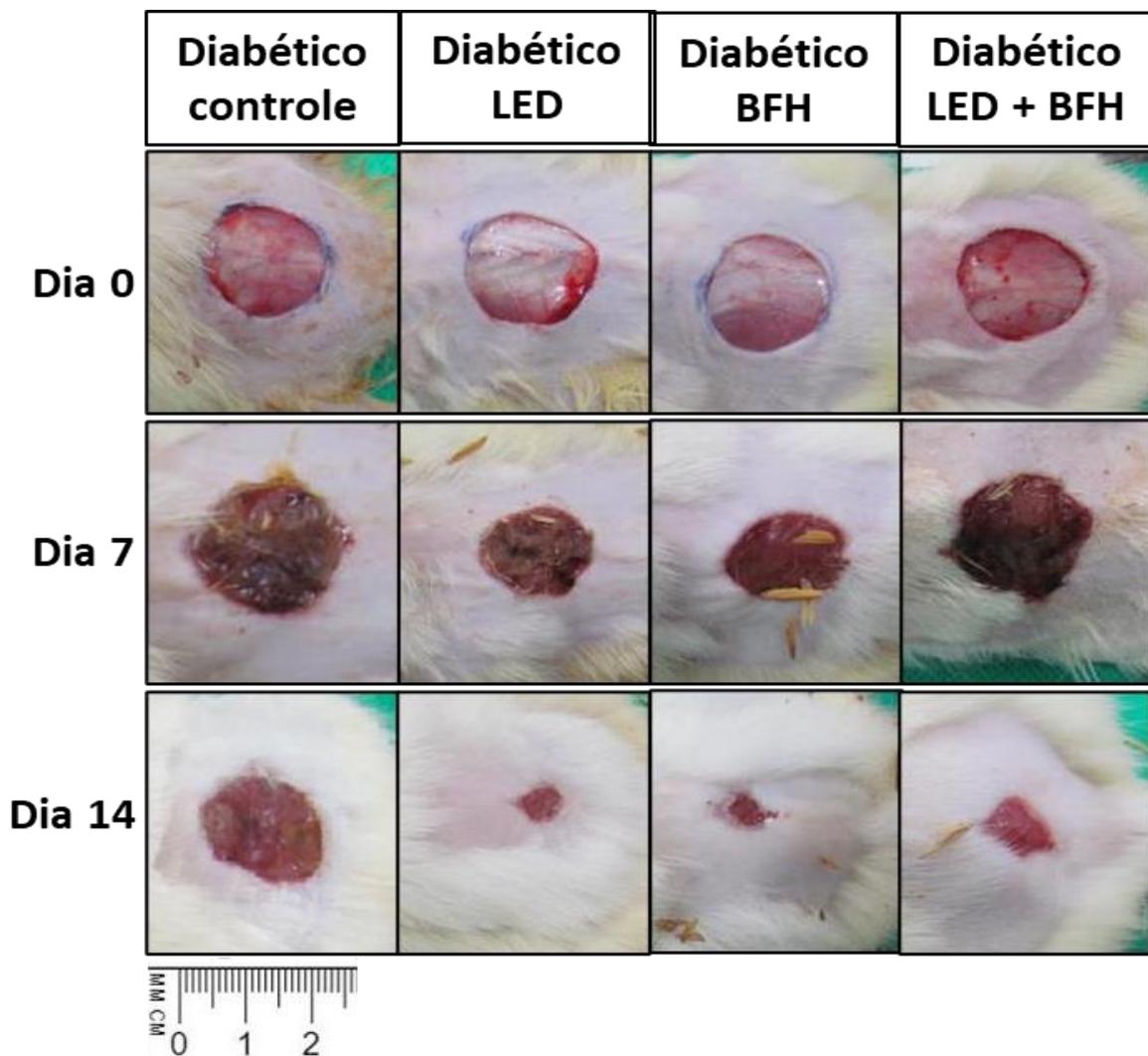
Grupo	7 dias		14 dias	
	Antes aplicação aloxana 2%	Após aplicação aloxana 2%	Antes aplicação aloxana 2%	Após aplicação aloxana 2%
<b>Diabético controle</b>	70,33 ± 6,40	313,5 ± 61,97	75,33 ± 8,73	358 ± 75
<b>Diabético LED</b>	74,83 ± 7,79	324,2 ± 90,03	79,5 ± 8,68	317,83 ± 83,03
<b>Diabético BFH</b>	70,83 ± 4,70	430,83 ± 136,25	71,33 ± 6,53	354,16 ± 111,75
<b>Diabético LED + BFH</b>	75,5 ± 5,99	368,33 ± 122,66	76,16 ± 7,22	400,33 ± 91,84

Fonte: autor

## 5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Nos achados macroscópicos obtidos na análise qualitativa dos grupos experimentais, foi possível observar a ausência de necrose, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade da lesão em todos os grupos experimentais. Na figura 6 pode-se observar as feridas de acordo com o grupo e o período de tratamento.

**Figura 6:** Análise macroscópica da ferida nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 0, 7 e 14 de experimento.



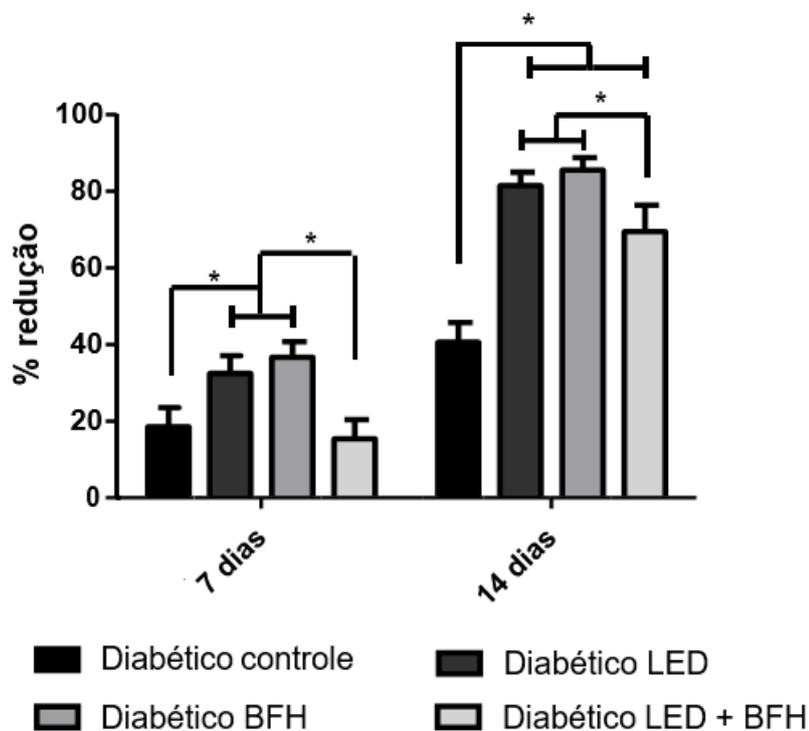
Legenda: Diabético controle = sem intervenção terapêutica; LED= Diodo Emissor de luz; BFH=Biopolímero de fibrina heterólogo; LED + BFH = Diodo Emissor de luz associado a Biopolímero de fibrina heterólogo.

Fonte: autor

### 5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A figura 7 mostra o percentual de redução do reparo da ferida. No 7º dia, os grupos tratados com LED e BFH apresentaram estatisticamente maior porcentagem de redução da área lesionada comparado aos grupos controle e LED + BFH. Ainda neste período experimental, o grupo que associou as terapias LED + BFH não demonstrou diferença estatística quando comparado ao grupo diabético controle. Após 14 dias, os três grupos tratados apresentaram maior regressão na área da ferida comparado ao diabético controle. Quando foi comparado os grupos tratados, notou-se que o grupo LED + BFH demonstrou menor redução da ferida comparado ao grupo que foi tratado apenas com LED ou BFH.

**Figura 7:** Índice de reparo de feridas nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 7 e 14 de experimento.



Legenda: \* diferença significativa; Controle = sem intervenção terapêutica; LED= Diodo Emissor de luz; BFH =Biopolímero de fibrina heterólogo; LED + BFH = Diodo Emissor de luz associado a Biopolímero de fibrina heterólogo.

Fonte: autor

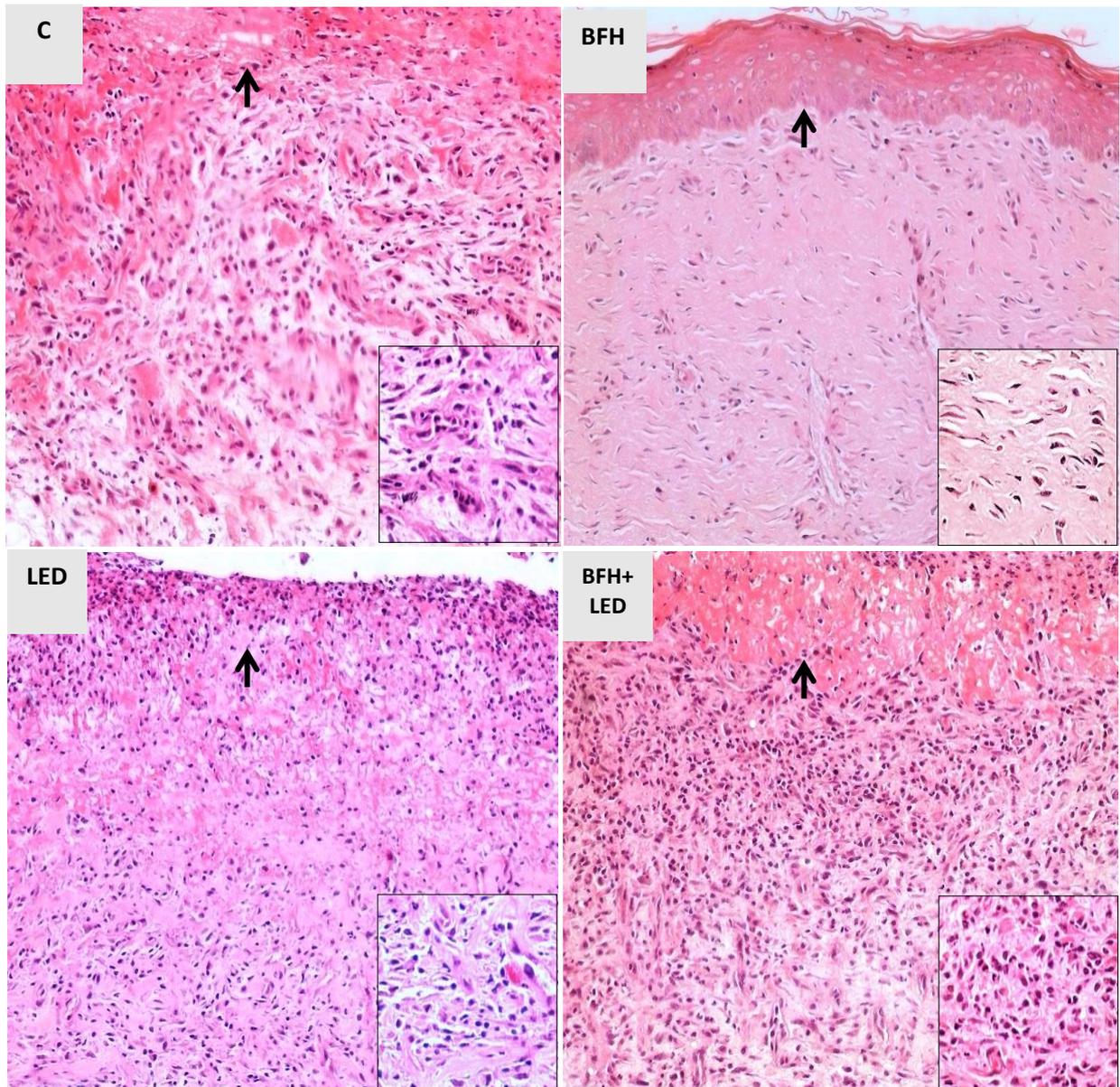
#### 5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

As Imagens histológicas representativas das feridas são apresentadas nas figuras 8 e 9. A análise histopatológica revelou que em todos os grupos experimentais, 7 dias pós-operatório (figura 7), as feridas estavam recobertas por crosta de espessura variável, composta por material fibrinohemorrágico e restos necróticos. O leito das feridas se mostrou ocupado por tecido de granulação, constituído por uma matriz extracelular (MEC) com diferentes graus de edema, contendo número variável de capilares neoformados, polimorfonucleares neutrófilos e células inflamatórias mononucleadas, principalmente macrófagos. Notaram-se diferenças entre os grupos e a documentação fotográfica, para efeitos comparativos, foi feita no centro das lesões. No grupo controle material fibrinohemorrágico e neutrofílico recobrimo a superfície das feridas (seta), não se observando reepitelização, MEC muito edemaciada, mostrando numerosos neutrófilos e angiogênese moderada. Os fibroblastos são escassos. No grupo biopolímero de fibrina heterólogo (BFH): epiderme neoformada madura (seta) recobrimo toda a superfície da ferida. Na derme, MEC compacta, contendo fibroblastos delgados dispostos em feixes paralelos à superfície. No grupo LED e grupo LED + biopolímero de fibrina heterólogo (LED+BFH): Ausência de reepitelização completa. As setas indicam deposição de material fibrinohemorrágico e neutrofílico na superfície da ferida, MEC ainda edemaciada, contendo neutrófilos, monócitos e fibroblastos dispostos aleatoriamente.

Com quatorze dias de evolução em todos os grupos (figura 8) as feridas estavam recoberta por crosta menos espessa e limitada às áreas não recobertas pela epiderme neoformada. O tecido de granulação no leito das feridas apresentou diferentes graus de maturação. No grupo controle epiderme neoformada (seta) recobrimo parcialmente a superfície da ferida. No grupo biopolímero de fibrina heterólogo reepitelização completa com epiderme madura (seta), MEC compacta, com raras células inflamatórias e fibroblastos finos dispostos em feixes paralelos à superfície. No grupo LED: ausência de reepitelização no centro da ferida e deposição de material fibrino-neutrofílico (seta), MEC levemente edemaciada com infiltração inflamatória moderada. Fibroblastos dispostos aleatoriamente. E no grupo LED+BFH epiderme neoformada (seta) recobrimo parcialmente o centro da ferida,

MEC levemente edemaciada, infiltrado inflamatório discreto e fibroblastos dispostos sem orientação definida.

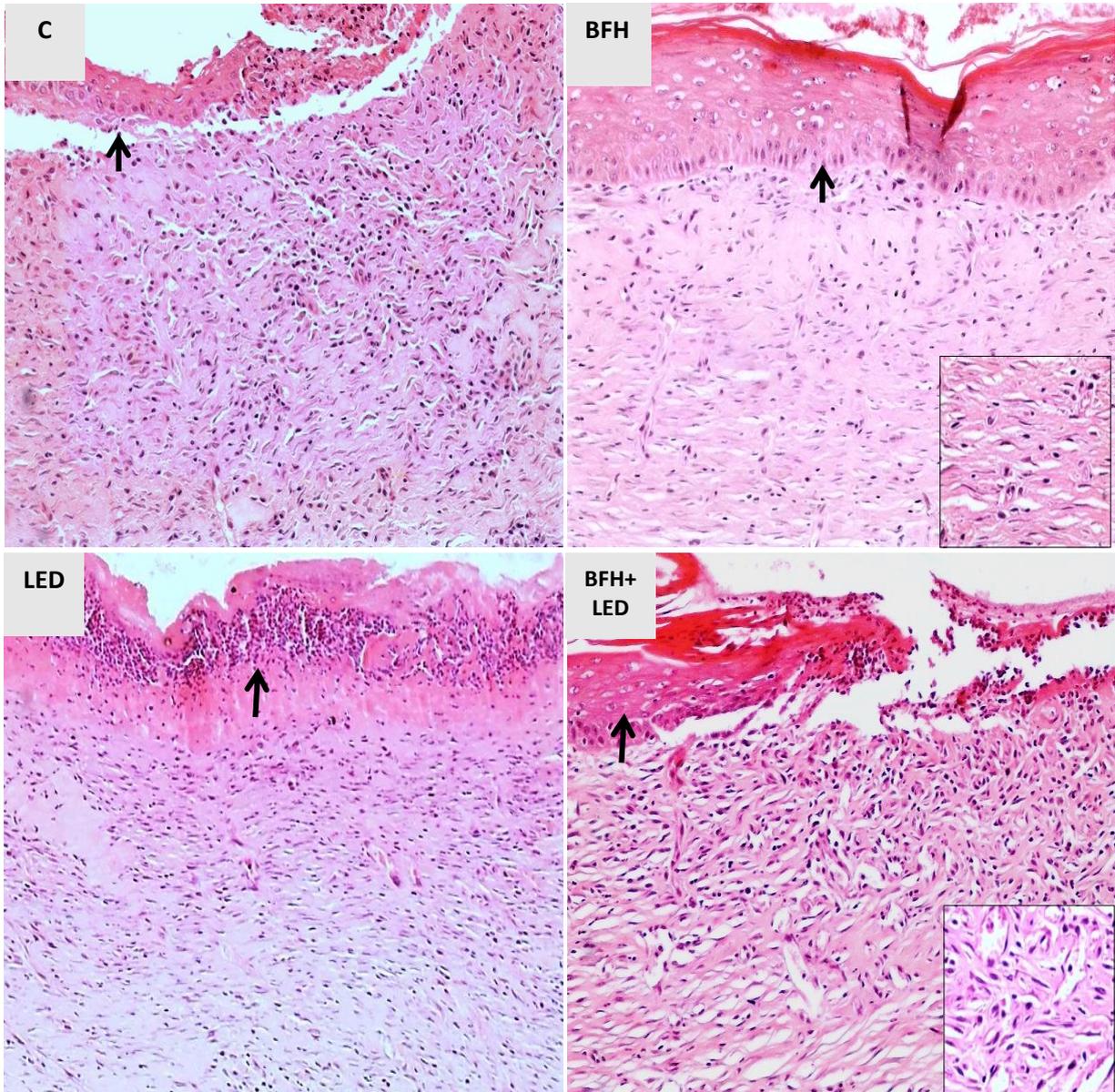
**Figura 8:** : Fotomicrografias representativas da análise histológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH no dia 7 de experimento.



Legenda: C= Controle sem tratamento; LED= Diodo Emissor de luz; BFH=Biopolímero de fibrina heterólogo; LED + BFH = Diodo Emissor de luz associado a Biopolímero de fibrina heterólogo. Coloração: HE. Aumento 100X e no realce de 400x

Fonte: autor

**Figura 9:** : Fotomicrografias representativas da análise histológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH no dia 14 de experimento.

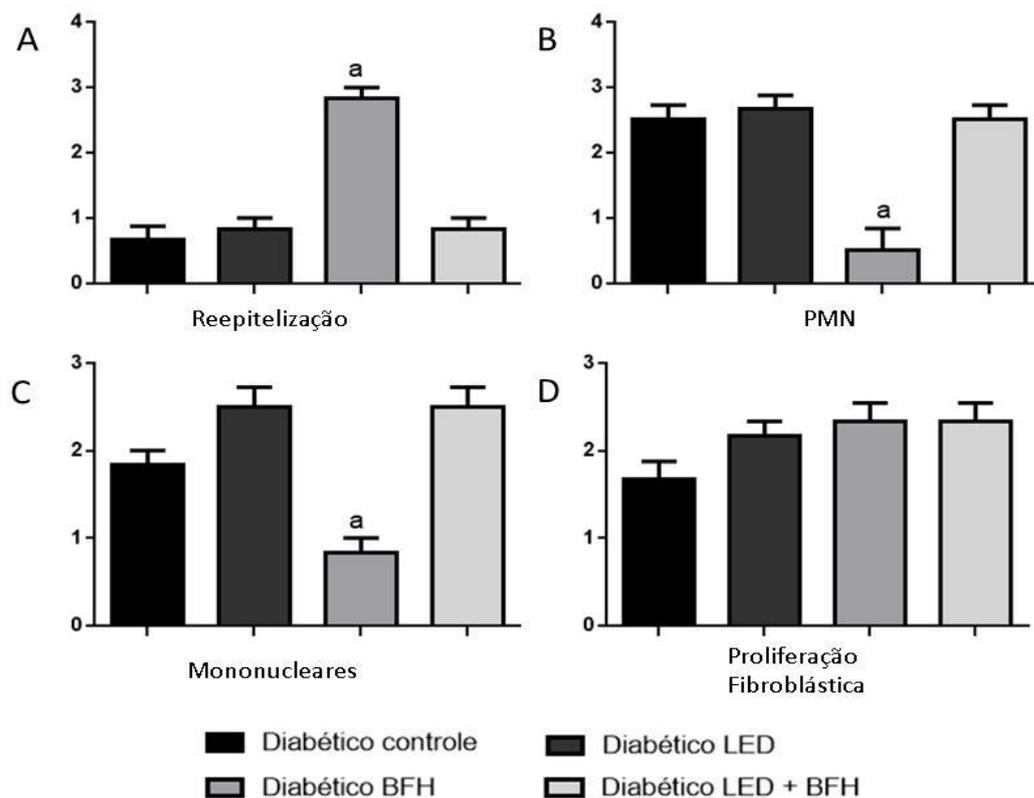


Legenda: C= Controle sem tratamento; LED= Diodo Emissor de luz; BFH=Biopolímero de fibrina heterólogo; LED + BFH = Diodo Emissor de luz associado ao Biopolímero de fibrina heterólogo. Coloração: HE. Aumento 100X e no realce de 400x  
Fonte: autor

## 5.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os resultados da avaliação histopatológica demonstraram diferença estatística nas fases de reparo tecidual entre os grupos experimentais. Para o critério reepitelização, após 7 dias, observou-se que o grupo controle apresentou escore estatisticamente menor quando comparado aos grupos BFH, resultado este que se manteve após 14 dias de tratamento (figuras 10 e 11). Nos PMN e monucleares observou-se que o grupo controle foi estatisticamente maior que o grupo BFH. Nos grupos restantes não foi observada diferença estatística. Após 14 dias, pode observar que o grupo diabético controle mostrou escore estatisticamente menor comparado ao grupos BFH levando em consideração a proliferação fibroblástica. Não houve diferença estatística nos PMN e mononucleares.

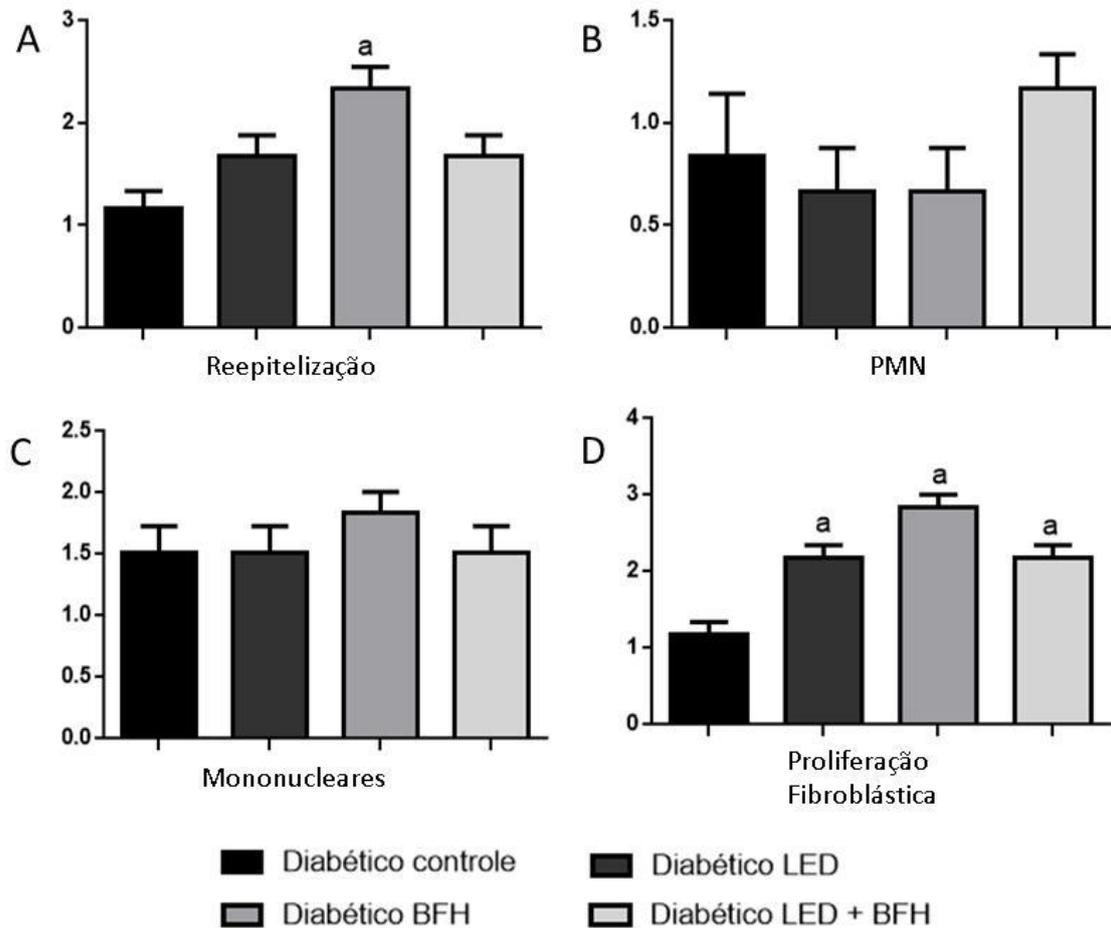
**Figura 10** :Classificação histopatológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH aos 7 dias de experimento.



Legenda: a=  $p < 0,05$  comparado aos grupos: Diabético controle, diabético LED e diabético LED + BFH

Fonte: autor.

**Figura 11:** Classificação histopatológica nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH aos 14 dias de experimento.

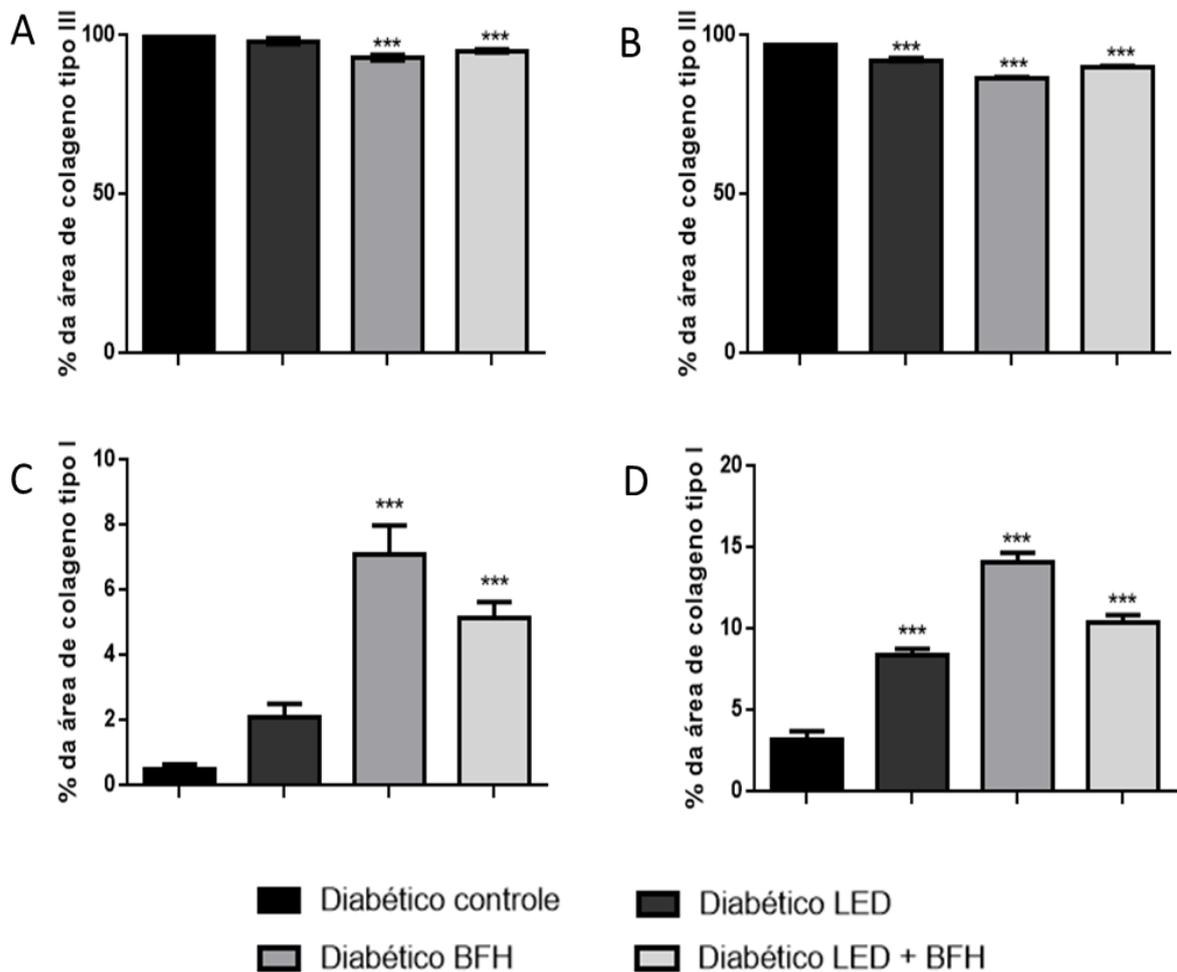


Legenda: a=  $p < 0,05$  comparado ao grupo diabético controle  
 Fonte: autor.

## 5.6 ANÁLISE DO COLÁGENO

Na figura 12 observa-se que ainda há um predomínio de colágeno imaturo (Tipo III), contudo já se pode evidenciar o aparecimento de colágeno maduro (Tipo I), embora em menor proporção nos grupos tratados com BFH, LED e BFH + LED com 7 dias e 14 dias.

**Figura 12:** Registro do percentual da área de colágeno tipo III e tipo I com 7 dias de tratamento com BFH, LED e BFH associado ao LED em A e C com 14 dias de tratamento em B e D



Legenda: \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo diabético controle.

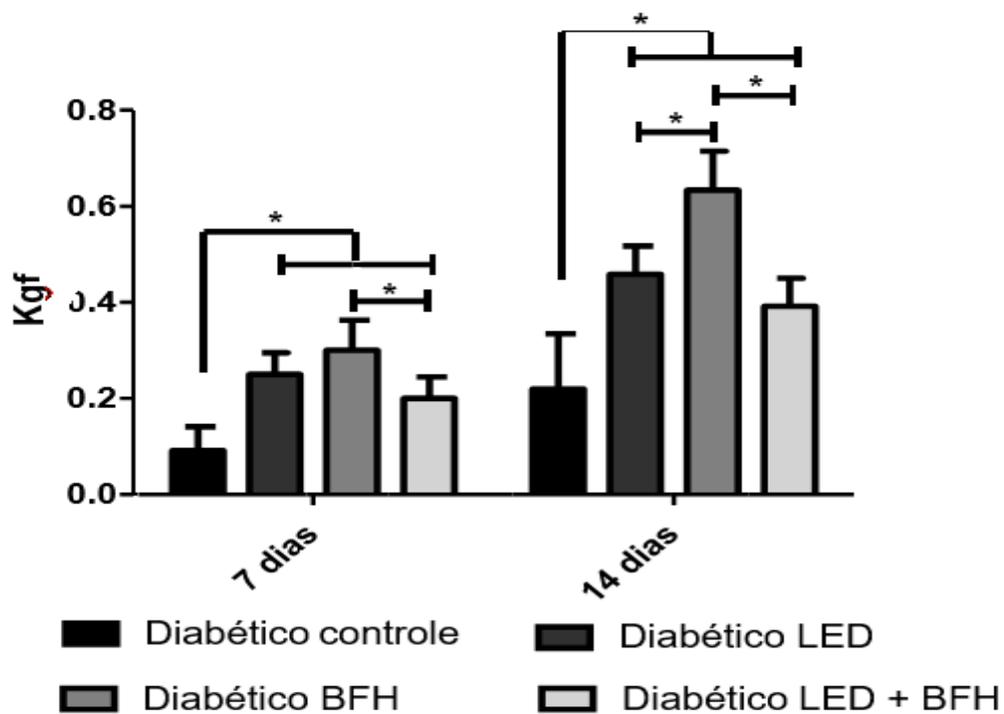
Fonte: autor.

## 5.7 ANÁLISE DA FORÇA DE TRAÇÃO

A figura 13 apresenta os resultados do teste da força de tração. É possível observar que, com 7 e 14 dias, a força de tração foi maior nos três grupos tratados

em relação ao grupo diabético controle. Quando foi comparados os tratamentos no período de 7 dias, notou-se que o grupo BFH demonstrou maior força de tração comparado ao grupo que recebeu a associação dos tratamentos LED + BFH. Da mesma forma, com 14 dias, o grupo BFH mostrou maior força de tração comparado aos grupos LED e LED + BFH.

**Figura 13:** Teste de resistência e força de tração nos grupos controle, LED, BFH e LED associado ao BFH nos dias 7 e 14 de experimento.



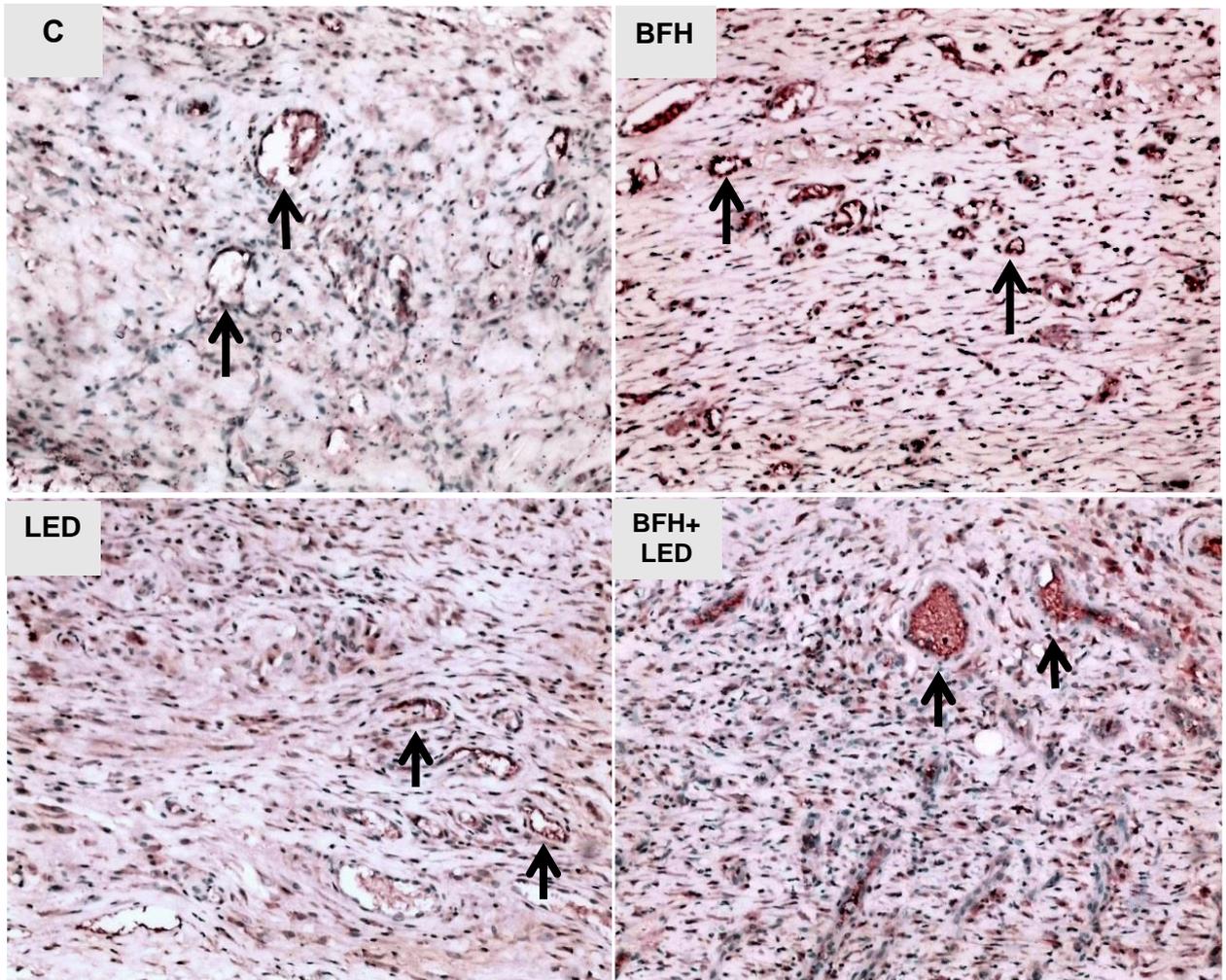
Legenda: \* = diferença significativa; Controle = sem intervenção terapêutica; LED= Diodo Emissor de luz; BFH =Biopolímero de fibrina heterólogo; LED + BFH = Diodo Emissor de luz associado a Biopolímero de fibrina heterólogo.

Fonte: autor

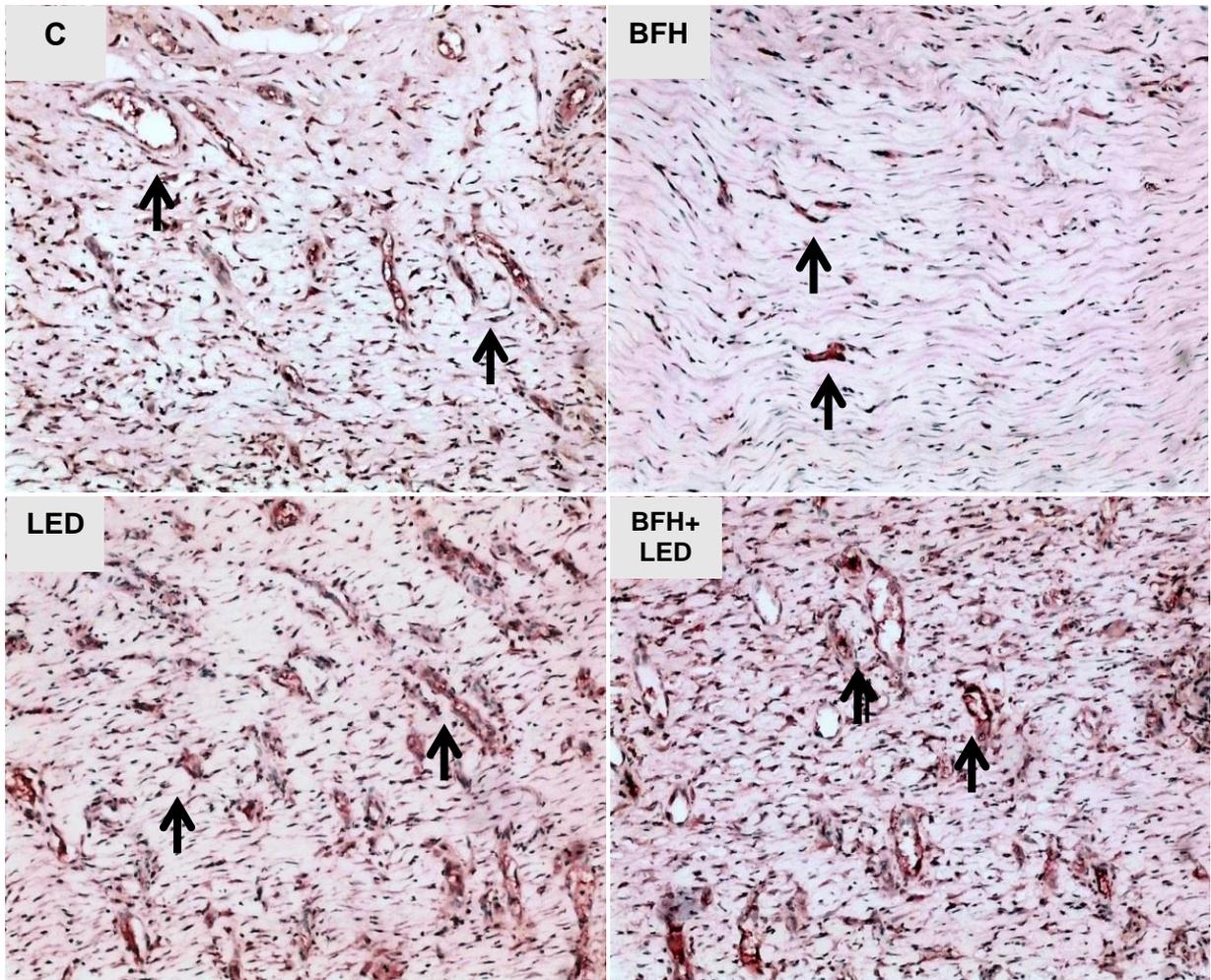
## 5.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica mostrou marcação citoplasmática positiva para células endoteliais, tornando possível uma identificação inequívoca dos vasos sanguíneos neoformados no tecido de granulação do leito das feridas. Aos sete dias de

evolução, esses vasos se mostraram mais abundantes e de diâmetro mais regular no grupo biopolímero de fibrina heterólogo(BFH) (figura 14). Com quatorze dias de evolução, este grupo, ao contrário dos demais, exibiu vasos muito reduzidos em número e em diâmetro (figura 15).



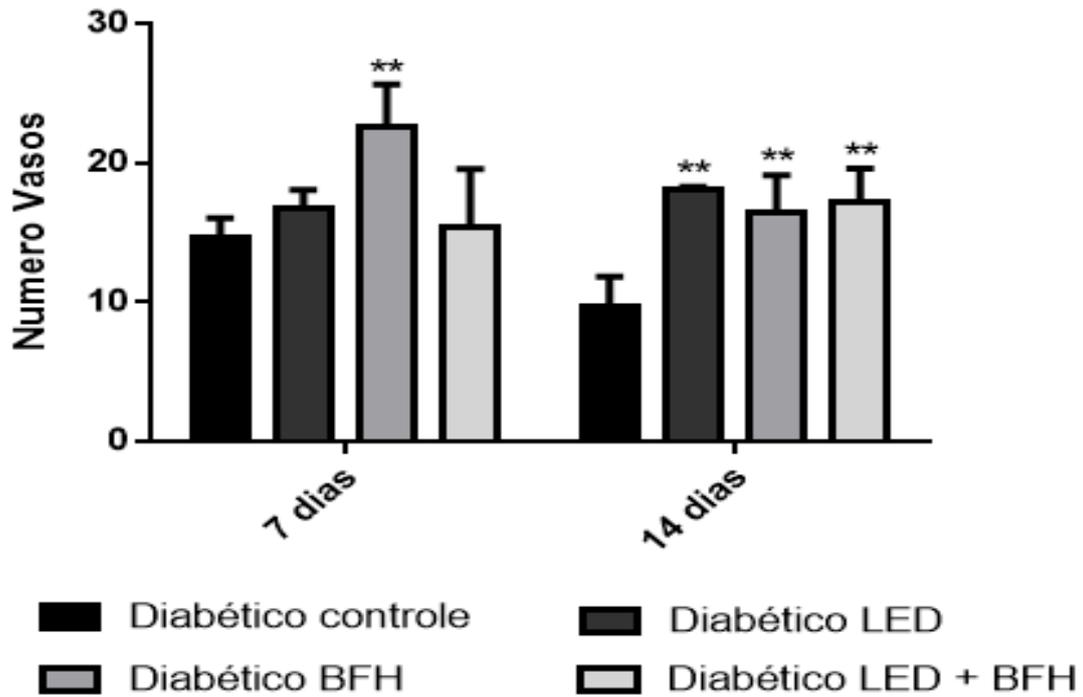
**Figura 14.** Imunohistoquímica para CD34, 7 dias de evolução. Marcação citoplasmática positiva para células endoteliais em pequenos vasos sanguíneos neoformados (setas), mais numerosos e de tamanho mais regular no grupo biopolímero de fibrina heterólogo. Grupo Controle (C). Grupo biopolímero de fibrina heterólogo(BFH). Grupo LED e Grupo LED+BFH. 100 x. Fonte: autor



**Figura 15.** Imunohistoquímica para CD34, 14 dias de evolução. Marcação citoplasmática positiva para células endoteliais em pequenos vasos sanguíneos neoformados (setas). No grupo biopolímero de fibrina heterólogo, os vasos são escassos e de diâmetro muito reduzido. Grupo Controle ( C ). Grupo biopolímero de fibrina heterólogo(BFH). Grupo LED e Grupo LED+BFH. 100 x. Fonte: autor

Na figura 16 é possível observar aumento significativo de vasos no grupo tratado com BFH quando comparado ao grupo controle no 7º dia de tratamento. Observa-se, também, um aumento significativo do número de vasos nos grupos BFH, LED e BFH associado ao LED quando comparado ao grupo controle no 14º dia de tratamento.

**Figura 16.** Registro do número de vasos após 7 e 14 dias de tratamento com BFH, LED e BFH associado ao LED.



Legenda: \*\*p < 0,05 quando comparado ao grupo diabético controle  
Fonte: autor

## 6 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus (DM) destaca-se, atualmente, como uma importante causa de morbimortalidade. O envelhecimento da população, a crescente prevalência da obesidade e do sedentarismo, e os processos de urbanização são considerados os principais fatores responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do DM em todo o mundo (FLOR,2017). O DM está relacionado ao reparo deficitário, devido às lesões vasculares (hipóxia) e às alterações nas células fagocitárias, que favorecem a instalação de infecções; ao estreitamento da perfusão sanguínea (vasculopatia); à neuropatia, redução da sensibilidade, por causa da diminuição de estímulos da inflamação liberados por terminações nervosas (SILVA *et al.*, 2019)

Uma ferida é estabelecida como uma interrupção da continuidade celular, anatômica e funcional de um tecido vivo podendo ser causada por agressões físicas, químicas, térmicas, microbianas ou imunológicas. Em uma ferida há rompimento na integridade epitelial e pode ser acompanhada por uma ruptura da estrutura e função do tecido normal. O agravo no reparo de feridas diabéticas é um processo multifatorial que afeta vários mecanismos necessários para o fechamento da ferida. Demonstra-se que feridas diabéticas em humanos e animais de laboratório exibem uma resposta inflamatória irregular e diminuição da neovascularização, em comparação com feridas não diabéticas (MASSON-MEYERS *et al.*, 2020).

Este estudo analisou o efeito da terapia por fotobiomodulação a LED, associado ou não, ao uso do biopolímero de fibrina heterólogo no reparo de feridas cutâneas em ratos diabéticos. Baseando-se nos achados macroscópicos e índice de reparo de feridas, os tratamentos utilizados de forma isolada, LED e BFH, demonstraram reparo cutâneo avançado quando comparado ao grupo controle. Além dos resultados positivos observados com o uso do LED e BFH na avaliação macroscópica, o presente trabalho constatou, também, microscopicamente que as variáveis como: fibroblastos, colágeno e vasos sanguíneos apresentaram diferença estatisticamente significativa maior comparado ao grupo controle.

Desta forma, evidenciamos, na análise microscópica, que os dois tratamentos utilizados de forma isolada modularam o processo inflamatório, pois foram capazes de promover a redução da fase de inflamação crônica anteriormente

comparado ao grupo controle. No trabalho em questão, os achados foram similares aos de Ferreira *et al.*, (2013) que observou um efeito positivo da terapia LED no processo de reparo de lesão tecidual em animais diabéticos. Assim, como Dall Agnol *et al.*, (2009), demonstrou redução significativa do diâmetro da ferida nos ratos diabéticos no grupo tratado com LED se comparado ao grupo controle.

A atividade do biopolímero de fibrina mimetiza a cascata de coagulação, na qual a trombina faz a conversão de fibrinogênio em fibrina, conduzindo a formação de um coágulo de fibrina estável e reforçado pela ativação do fator XIII, estimula a proliferação de fibroblastos e participa da síntese de colágeno (ABADDE *et al.*, 2021; ORSI *et al.*, 2017). A terapia por fotobiomodulação tem a capacidade de promover modificações bioelétricas, bioquímicas e bioenergéticas, de acelerar o metabolismo tecidual, promover a modulação da resposta inflamatória, aumentar a proliferação celular assim como a quantidade de tecido de granulação e deposição de colágeno, estimulando o processo de reparo (FERREIRA *et al.*, DE LOURA SANTANA *et al.*, 2015; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2016; AHMED *et al.*, 2018). Esta pesquisa sugere que o aumento da variável fibroblastos observado microscopicamente nos grupos LED e BFH e a proliferação celular foram capazes de promover o aumento da deposição de colágeno.

Comparando os tratamentos com LED e BFH, evidenciou-se que ambos foram capazes de estimular e acelerar o processo de reparo tecidual, contudo observou-se que a maturação do tecido com o tratamento com BFH demonstrou ser mais eficaz em estimular a organização do colágeno e conseqüentemente aumentar a força de tração no local da lesão. O LED e o BFH aumentaram a deposição de colágeno tipo I e diminuíram colágeno tipo III, sugerindo que os tratamentos aceleram o reparo tecidual com a substituição do colágeno tipo III de forma gradual pelo colágeno tipo I. A nossa pesquisa mostrou que o LED e o BFH promoveram a maturação do colágeno assim como aumentaram a força de tração no sítio de formação do novo tecido. A avaliação dos tratamentos que associou LED + BFH não mostrou um efeito superior ao uso isolado do LED e BFH corroborando com o estudo de Dutra Júnior *et al.*, (2021) em reparos de tendão calcâneo em ratos.

A investigação da angiogênese por imunohistoquímica usando marcadores endoteliais como o CD34 tem uma abordagem comum em estudos de cicatrização de feridas, conforme revisado recentemente por Masson-Meyers *et al.*, (2020).

O tratamento com BFH mostrou ser promissor no tratamento lesões cutâneas no diabetes, reduzindo a área, aumentando a resistência e favorecendo a cicatrização, assim com o uso do LED. A utilização do LED e BFH não mostrou uma melhor eficácia quando associados. Novos estudos devem ser realizados analisando se a energia utilizada e se a frequência de aplicação do LED ( 24 a 48 horas após o uso do biopolímero ) modifica a ação do BFH.

A nossa pesquisa apresentou limitações no que diz respeito à indução dos ratos à diabetes. Tivemos que realizar várias adequações ao protocolo utilizado. Vários animais tornavam-se diabéticos, somente, na segunda ou terceira aplicação da aloxana. A pandemia de covid 19 foi outro empecilho, pois nosso estudo foi paralisado, para atender as exigências dos protocolos, gerando atraso e perda de animais que estavam sendo estudados.

## 7 CONCLUSÃO

Nos testes realizados observou-se que os tratamentos com LED, BFH e LED associado ao BFH atuaram de forma efetiva favorecendo a melhora no processo de reparo tecidual, indicando que estes tratamentos, isolados ou associados, foram eficazes em estimular o processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos, mas os tratamentos isolados de BFH e LED apresentaram melhores resultados.

Assim, a utilização do LED e do BFH despontam como importantes ferramentas terapêuticas para o auxílio do processo de reparo tecidual no diabetes.

Novos experimentos devem acontecer, avaliando-se a ação da utilização do BFH e FBM associados, contudo com a aplicação em intervalos maiores.

## REFERÊNCIAS

- ABBADE L.P.F. et al. Treatment of Chronic Venous Ulcers With Heterologous FibrinSealant: A Phase I/II Clinical Trial. **Front Immunol.** v12, p.62754, 2021. Published 2021 Feb 23. doi:10.3389/fimmu.2021.627541
- AHMED, Osama M. *et al.* Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 58-73, 2018.
- ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, [S.l.], v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015.
- ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p.69-82, jan. 2014.
- BACELETE, V.S.B.; GAMA, A.C.C., Therapeutic effects of photobiomodulation in the speech-language-hearing clinic: an integrative literature review. *Rev. CEFAC.* 2021;23(1):e9120.
- BARBIZAN R., *et al.* Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. **PLoS One.** v. 8 n. 5: p. 614 – 632. 2013.
- BARBOSA M.D., *et al.* Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Periodontol.** v. 78. n.10 p 2026-2031. 2007.
- BENDINELLI B *et al.* Association between dietary meat consumption and incident type 2 diabetes: **the EPIC-InterAct study.** **Diabetologia**, v. 56, n. 1, p.47-59, 2012.
- BORENA, Bizunesh M. *et al.* Regenerative skin wound healing in mammals: state-of- the-art on growth factor and stem cell based treatments. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 1-23, 2015.
- BORISSOVA, AM *et al.* Changes in the prevalence of diabetes mellitus in Bulgaria (2006-2012). **Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.** v. 8, p. 41-45, 2015.
- CHENTLI, Farida; AZZOUG, Said; MAHGOUN, Souad. Diabetes mellitus in elderly. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 19, n. 6, p. 744, 2015.
- CHILDS, Dylan R.; MURTHY, Ananth S. Overview of wound healing and management. **Surgical Clinics**, v. 97, n. 1, p. 189-207, 2017.
- COLETTA, B. B .D. *et al.* Biopolímero de fibrina e suas aplicações clínicas: revisão sistemática. **Anais.** Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2019.

CORTEZ, Daniel Nogueira *et al.* Costs of treating skin lesions in Primary Health Care. **Estima–Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, v. 17, 2019.

DALL AGNOL M. A. *et al.* Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med Sci**. n.24, p.909–916, 2009.

DE LOURA SANTANA, Cristiano *et al.* Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122042, 2015.

DE MORAES PRIANTI, Bruno *et al.* Evaluation of the therapeutic effects of led ( $627\pm 10$  nm) on the initial phase of ankle sprain treatment: a randomised placebo- controlled clinical trial. **Lasers in medical science**, p. 1-8, 2018.

DE PAULA GOMES, C. A. F *et al.* Efficacy of pre-exercise low-level laser therapy on isokinetic muscle performance in individuals with type 2 diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 15, n. 1, p. 116, 2014.

DUTRA JÚNIOR, E. F *et al.* Tratamento da lesão parcial do tendão calcâneo com biopolímero de fibrina heteróloga e / ou fotobiomodulação em ratos. **Lasers Med Sci** (2021). <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03341-x>

ERENO, D. Veneno que cola. **Revista Pesquisa FAPESP**. Abril, 2009.

FERRARO, G. C. *et al.* Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 433-446, 2005.

FERREIRA, C. L. R. *et al.* Efeito da terapia LED ( $\lambda = 945\pm 20$  nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, p. 404-413, 2013.

FLOR, Luisa Sorio; CAMPOS, Monica Rodrigues. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 20, p. 16-29, 2017

FRYKBERG, Robert G.; BANKS, Jaminelli. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances in wound care**, v. 4, n. 9, p. 560-582, 2015.

FORTUNA T.; GONZALES A.C.; SÁ M.F.; ANDRADE Z.A.; REIS S.R.A.; MEDRADO A.R.A.P. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair, 2017

GASPAROTTO V.P.O., *et al.* A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v.5: p.78. 2014.

GONÇALVES, Bianca Mariani. Impacto das vias intrapancreática, intravenosa e intra-capsular renal no transplante de células-tronco mesenquimais–regeneração morfofuncional do diabetes tipo I experimental. 2018.

IATECOLA A., *et al.* Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair

of skull defects in rats. *Brazilian dental journal*. v. 24. n. 5: p. 456-461, 2013.

JUNQUEIRA, Luiz C; CARNEIRO, Jose. *Histologia básica: texto, atlas*. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 488p.

KALRA, Sanjay *et al.* Endemic or epidemic? Measuring the endemicity index of diabetes. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 19, n. 1, p. 5, 2015.

KARU, T. I. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 20, n.2, p. 143-148, 2014.

KHARROUBI, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal Of Diabetes**, v. 6, n. 6, p.850-860, 2015.

LEAL JUNIOR, E. C. P *et al.* Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers in a Medical Science**, v. 24, p. 425–431, 2009.

LEE YH, Chang JJ, Chien CT, Yang MC, Chien HF. Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res*. 2012;

LEITE, C. V. S. *et al.* An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6,n. 2, p. 180-193, 2000.

LIMA, Carla Lidiane Jácome de *et al.* Characterization of users at risk of developing diabetes: a cross-sectional study. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 71, p. 475- 482, 2018.

LIMA, M. H.M., ARAUJO, E. P. *Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea*. **Cogitare Enfermagem**, [S.l.], v. 18, n. 1, mar. 2013. ISSN 2176-9133.

LIMA, P. R. **Biopolímero de Fibrina como arcabouço biológico para células-tronco mesenquimais como potencial produtor osteogênico. Tese (doutorado)** Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu” Botucatu, p.60. 2019.

LUCIO, Flávia Daniele; PAULA, Carla Fernanda Batista. Fotobiomodulação no processo cicatricial de lesões-estudo de caso. **CuidArte, Enferm**, p. 111-114, 2020.

MACEDO, Suellen Pereira Rodrigues *et al.* Efeitos da fotobiomodulação no tratamento de úlceras por pressão: Revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e32810212597-e32810212597, 2021.

MASSON-MEYER, D.S,*et al.* Modelos experimentais e métodos de avaliação da cicatrização de feridas cutâneas. *International Journal of Experimental Pathology*. Fevereiro de 2020; 101(1-2): 21-37:DOI: 10.1111/iep.1246. PMID: 32227524

MENDONCA, Rosimeri da Silva Castanho; RODRIGUES, Geruza Baima de Oliveira. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **ABCD**,

**arq. bras. cir.dig.** v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011.

MEYER, Patrícia Froes *et al.* Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v. 11, n. 6, p. 428-432, 2010.

MINATEL, Débora Garbin *et al.* Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 279-283, 2009.

MONSEF, Jad Bou *et al.* Fibrin sealants or cell saver eliminate the need for autologous blood donation in anemic patients undergoing primary total knee arthroplasty. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 134, n. 1, p. 53-58, 2014.

MOSTAFAVINIA, Ataroalsadat *et al.* The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. **Laboratory animal research**, v. 32, n. 3, p. 160- 165, 2016

MOURA, W. P.F *et al.* Efeito do gel a base de Moringa oleifera lam. como fitoterapia na cicatrização de feridas, **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, e4109119957, 2020

NGUYEN T. H *et al.* Type 2 diabetes among Asian Americans: Prevalence and prevention. **World J Diabetes**. v. 6, p. 543-547, 2015.

NYAME, T.T., CHIANG, H.A., ORGILL, D.P. Clinical Applications of Skin Substitutes. **Surg Clin N Am**, v. 94 p. 839–850, 2014.

OLCZYK, Pawel; MENCNER, Łukasz; KOMOSINSKA-VASSEV, Katarzyna. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

OLIVEIRA, C.T.B; *et al.* Effects of fibrin sealant and bone fragments on defect regeneration performed on rat tibiae: An experimental study. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 104, p. 103662, 2020.

OLIVEIRA, IVPM.; DIAS, RVC. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012

ORSI P.R.,*et al.* A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. **Stem Cell Res Ther.** Sep 29; v. 8, n. 1, p. 205. 2017. doi: 10.1186/s13287-017-0654-7.

ORYAN, Ahmad; SAHVIEH, Sonia. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1003-1011, 2017.

PATROCINIO-SILVA, Tatiane Lopes *et al.* Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. **Arch. Endocrinol. Metab.**, São Paulo , v. 60, n. 5, p. 457-464, Oct. 2016.

PAULA, S. Comparação do laser e do led no processo de cicatrização em feridas

cutâneas: uma revisão Comparison of laser and led in the process of healing cutaneous wounds: a review. **Ciência e saúde**, v.9, n.1, p. 55-61, 2016.

PESSOA, D.R. *et al.* Efeitos da terapia laser de baixa intensidade em modelo experimental de tendinopatia em ratos: revisão de literatura. **Revista Univap**, v.23, n. 34, p 102-112,2017.

PINTO, D. M.; BASTIANETTO, P. Tratamento percutâneo do pseudoaneurisma femoral: comparação entre selante de fibrina e trombina. **J Vasc Bras**. 2013 Out.-Dez.; 12(4):264-270.

PUNTHAKEE, Z *et al.* Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. **Canadian journal of diabetes**, v. 42, p. S10-S15, 2018.

QI, Yu *et al.* TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 2, p. 526-537, 2014.

RAHAL, S. C. *et al.* Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 161-172, 2004.

RAMOS, L.A.V *et al.* A Eficácia do Laser de Baixa Potência na Cicatrização de Úlcera de Decúbito em Paciente Diabético: Estudo de Caso. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 2, p.74-79, 2014.

REZENDE, K.F *et al.* "Internações por pé diabético: comparação entre o custo direto estimado e o desembolso do SUS." **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia** 52 (2008): 523-530.

RIDIANDRIES, Anisyah; TAN, Joanne; BURSILL, Christina. The Role of Chemokines in Wound Healing. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3217, 2018.

SALAZAR, Jay J.; ENNIS, William J.; KOH, Timothy J. Diabetes medications: Impact on inflammation and wound healing. **Journal of Diabetes and its Complications**, v.30, n. 4, p. 746-752, 2016.

SANCHEZ, A.D.; ANDRADE, A. L.M.; PARIZOTTO, N.A. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no controle da dor neuropática em camundongos. **Fisioter. Pesqui.**, São Paulo , v. 25, n. 1, p. 20-27, Mar. 2018.

SCARDINO, Marco *et al.* Use of a fibrin sealant within a blood-saving protocol in patients undergoing revision hip arthroplasty: effects on post-operative blood transfusion and healthcare-related cost analysis. **International orthopaedics**, p. 1-8,2019.

SILVA D. R. A.; *et al.*, Pressure ulcer dressings in critical patients: a cost analysis. **Rev Esc Enferm**, 2017.

SILVA, F. M. *et al.* Uso de Fototerapia para cicatrização de feridas de pés diabéticos. **Hegemonia: Revista de Ciências Sociais**, n. 27, p. 20, 2019.

SIMÕES, T. M. S., *et al.* Photobiomodulation of red and green lights in the repair process of third-degree skin burns. **Lasers in Medical Sciencen**, n.35,v1, p.51–61. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02776-7>.

SUN, Bryan K.; SIPRASHVILI, Zurab; KHAVARI, Paul A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, v. 346, n. 6212, p. 941-945, 2014.

TREVISAN, Eduardo Santos *et al.* Uso do fotobiomodulação no tratamento de osteoartrite de joelhos: avaliação da marcha. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e659108098-e659108098, 2020.

VICENTE, E.J.D., *et al.* Regeneração do nervo periférico por meio de coaptação com cola de fibrina. **Rev. Méd. Hosp.Univ.**2007; v. 33 p. 53–56.

WALKER, M. *et al.* A real-life clinical evaluation of a next-generation antimicrobial dressing on acute and chronic wounds. **Journal of wound care**, v. 24, n. 1, p. 11-22, 2015.

WHITING DR, *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 94, p.311-321, 2011.

ZENG, Ruijie *et al.* Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. **Cell and tissue research**, p. 1-16, 2018.

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO AO SELANTE DE FIBRINA NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS”. Protocolo número 0298/2019, sob responsabilidade de **Antonio Luiz Martins Maia Filho**, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO HETEROGÊNICO	MACHO	>2 MESES	250 g	03 ANOS	128

TERESINA, 28 DE FEVEREIRO DE 2019

  
Dr. Francisco Araújo  
Sub-Coordenador CEUA/UESPI  
Portaria Nº 1347 - 20/11/14  
CRMV - 0415/17