



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

WANDERSON FERNANDES SILVA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E ALTA FREQUÊNCIA NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Santarém – PA

2019

WANDERSON FERNANDES SILVA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E ALTA FREQUÊNCIA NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração Fisiologia Ambiental.
Orientadora: Dra. Adriana Caroprezzo Morini

Santarém – PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SIBI/UFOPA

-
- S586e Silva, Wanderson Fernandes
Efeito da associação da terapia com laser de baixa potência e alta frequência no processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos / Wanderson Fernandes Silva. - Santarém : UFOPA, 2019.
54 f.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Adriana Caroprezio Morini.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Laserterapia. 2. Alta frequência. 3. Úlceras. I. Morini, Adriana Caroprezio, Orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 615.8

WANDERSON FERNANDES SILVA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E ALTA FREQUÊNCIA NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração Fisiologia Ambiental.
Orientadora: Dra. Adriana Caroprezio Morini

Conceito: Aprovado

Data de aprovação: 02/ 06/ 2019

BANCA EXAMINADORA:



Profª Dra. Adriana Caroprezio Morini – Orientador
UFOPA-IBEF



Prof Dr. Maxwell Barbosa de Santana – Membro avaliador
UFOPA-ICTA



Prof Dr. Juarez de Souza – Orientador – Membro avaliador
UEPA

DEDICATÓRIA

Ao Eterno, A minha mãe, Ao meu pai, A minha irmã e aos meus amigos por todas as coisas boas que fizeram em minha vida e todo apoio sem limites.

AGRADECIMENTOS

Com muita felicidade manifesto meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar ao Eterno, por esta sempre ao meu lado, concedendo-me saúde, paz, energia e harmonia e por ser responsável por tudo de bom que aconteceu e acontece em minha vida.

À minha mãe Ivanilce Fernandes da Silva, por ajudar-me em todos os momentos difíceis, por ser paciente e companheira, por não me deixar desanimar durante a minha jornada e pelo grande amor que tem demonstrado por mim.

A meu colega Brenno de Sousa, pelo companheirismo, paciência e auxílio durante toda realização desse estudo.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Adriana Caroprezo Morini, pela dedicação, ensino e pelo desafio de ter aceitado orientar-me.

À minha irmã Angelina Fernandes Silva, pela ajuda durante toda a elaboração dessa dissertação, pelas dicas e tudo de bom que tem feito por mim.

À minha prima Aline Pedroso Fernandes, por auxiliar na correção ortográfica desse estudo.

A minha amiga Alessandra de Couto Ferreira pelo empréstimo de materiais necessários para a realização do presente estudo.

A meu colega Gustavo Marques da Rocha pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

A meu colega Guilherme Marques da Rocha pelo apoio e amparo na elaboração do projeto de pesquisa.

Ao prof. Dr. Juarez de Souza, por todo auxílio concedido e facilidade obtidas para a realização dessa pesquisa.

À Universidade Federal do Oeste do Estado do Pará, pelo curso de biociência e pela disponibilidade de bolsas de estudo e pelo amparo dado a mim durante todo o trajeto.

À Universidade do Estado do Pará, por sua contribuição e apoio com materiais e animais para a execução do presente estudo.

Ao Instituto esperança de ensino superior por seus laboratórios cedidos e auxílio com materiais.

Aos técnicos dos laboratórios pela ajuda durante o cuidado com os animais em alimentação e limpeza do local.

É por fim agradeço a todos que de certa forma contribuíram para a realização dessa dissertação, muito obrigado.

EPÍGRAFE

“O contrário de “impossível” não é “possível”.
É “determinação”.
Jackie Robinson”

RESUMO

Introdução: As úlceras representam uma importante intercorrência a saúde humana julgada pelo aspecto social e econômico devido ao longo tempo e dificuldade na cicatrização.

Objetivo: Avaliar o efeito do laser de baixa potência de 660nm associado a terapêutica com alta frequência sobre o processo de cicatrização e reparo tecidual em úlceras cutâneas.

Materiais e métodos: O desenvolvimento da pesquisa ocorreu nos laboratórios da Universidade Federal do Oeste do Pará, Universidade do Estado do Pará e Instituto Esperança de Ensino Superior em Santarém. O período de realização da pesquisa ocorreu entre abriu e novembro de 2018. Foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar separados em 4 grupos quanto ao tipo de tratamento, compostos por 5 animais cada. Grupo GC (Grupo Controle - recebeu a lesão, entretanto, sem nenhum tratamento). Grupo GL (Grupo Laserterapia - recebeu a lesão e foi tratado com Laserterapia). Grupo GAL (Grupo Alta frequência - recebeu a lesão e foi tratado com Alta frequência). Grupo GL+Al (Grupo Laserterapia e alta frequência - recebeu a lesão e foi tratado com laserterapia e alta frequência associada). Após a ocorrência da lesão, os animais iniciaram sessões de terapia diárias pré-determinadas para cada grupo, estabelecidas de forma aleatória, por dez dias consecutivos. A eutanásia dos animais ocorreu no 11º dia após a lesão inicial. **Resultados:** Ao final do tratamento foi possível observar de forma significativa ($p < 0,01$) menor área de lesão no GL em comparação com o grupo GAL. Também foi possível observar redução significativa ($p < 0,05$) no GALxGL em comparação com o GAL. Não houve diferença significativa entre os tipos de colágenos em cada grupo analisado ($p > 0,05$). **Conclusão:** O laser de baixa potência é capaz de modular de forma eficiente o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos macroscópicos e microscópicos. O gerador de alta frequência não é capaz de modular de forma eficiente o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos macroscópicos, no entanto melhora o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos microscópicos, O laser de baixa potência associado ao gerador de alta frequência apresentar bons resultados no processo de reparo tecidual.

Palavras-chave: Laserterapia. Alta frequência. Úlceras.

ABSTRACT

Introduction: Ulcers represent an important intercurrent of human health judged by the social and economic aspect due to the long time and difficulty in cicatrization. **Objective:** To evaluate the effect of the 660nm low power laser associated with high frequency therapy on the healing process and tissue repair in cutaneous ulcers. **Materials and methods:** The research was carried out in the laboratories of the Federal University of the West of Pará, State University of Pará and Esperança Institute of Higher Education in Santarém. The research period was between November and November 2018. Twenty Wistar rats were divided into 4 groups, each consisting of 5 animals each. Group GC (Control Group - received the lesion, however, without any treatment). Group GL (Laser therapy group - received the lesion and was treated with Laser therapy). Group GAL (High frequency group - received the lesion and was treated with High frequency). Group GL + AI (Group Lasertherapy and high frequency - received the lesion and was treated with laser therapy and associated high frequency). After the occurrence of the lesion, the animals started pre-determined daily therapy sessions for each group, established randomly, for ten consecutive days. Euthanasia of the animals occurred on the 11th day after the initial lesion. **Results:** At the end of treatment it was possible to observe significantly ($p < 0.01$) lower lesion area in GL compared to the LAG group. It was also possible to observe a significant reduction ($p < 0.05$) in GALxGL compared to LAG. There was no significant difference between the types of collagens in each group analyzed ($p > 0.05$). **Conclusion:** The low power laser is able to efficiently modulate the process of repairing skin wounds based on macroscopic and microscopic aspects. The high frequency generator is not able to efficiently modulate the skin wounds repair process based on macroscopic aspects, however it improves the repair process on skin wounds based on microscopic aspects. The low power laser associated with the generator of high frequency present good results in the process of tissue repair.

Keywords: Laser therapy. High frequency. Ulcers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Equação demonstrando a formação de ozônio pela interação do campo eletromagnético com o oxigênio molecular atmosférico.	22
Figura 2 – Execução dos arquivos de imagens pelo software ImageJ.	28
Figura 3 – Escolha dos parametros a serem avaliados por meio do software.	28
Figura 4 – Seleção do parâmetro de análise desejado no software.	29
Figura 5 – Calibração da imagem com o auxílio de um instrumento de medida.	29
Figura 6 – Conversão de valores em pixels para cm.	30
Figura 7 – Delineamento da ferida e posterior análise de área.	30
Figura 8 – Fotografia em grande aumento de uma lâmina de tecido cutâneo corada em <i>Picro-Sirius Red</i> .	32
Figura 9 – Processamento da imagem da lâmina microscópica com a ferramenta <i>Color Threshold</i> .	32
Figura 10 – Processamento da imagem com a ferramenta <i>Color Threshold</i> : Ajuste dos valores.	33
Figura 11 – Modelo esquemático para a obtenção dos valores percentuais de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas.	34
Figura 12 - Modelo esquemático para a obtenção dos valores percentuais de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas.	34
Figura 13 – Modelo esquemático para a obtenção dos valores percentuais de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas.	35
Figura 14 – Contagem de fibroblastos com o auxílio da ferramenta <i>Multi-point</i> .	36
Figura 15 – Evolução da área de ferida em um rato wistar de cada grupo nos dias: 1, 3, 7 e 11.	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Área das lesões ao longo dos dias de experimento com média e desvio padrão. 38
- Tabela 2. Dados de área das feridas (cm²) cutâneas em ratos wistar com média e desvio padrão, teste *t de student* intragrupo antes e depois da terapia. 39
- Tabela 3. Análise de variância (*ANOVA 1 critério*), e teste *tukey*, entre os grupos após 11 dias de tratamento. 39
- Tabela 4. Percentual de colágeno tipo I, tipo III e contagem de fibroblastos nos diferentes grupos de pesquisa. 40
- Tabela 5. Análise de variância (*ANOVA 1 critério*), entre os grupos com base nas variáveis colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibroblastos. 41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação da área da ferida ao longo dos dias de experimento nos diferentes grupos de tratamento.	38
Gráfico 2 – diferença entre o percentual médio de colágeno entre os grupos de tratamento, teste ANOVA 1 critério.	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 ÚLCERAS CUTÂNEAS	17
3.2 REPARO TECIDUAL	18
3.3 LASER DE BAIXA POTÊNCIA	19
3.4 ALTA FREQUÊNCIA	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 DESIGN DE ESTUDO	23
4.2 LOCAL E PERÍODO	23
4.3 PRINCÍPIOS ÉTICOS DA PESQUISA	23
4.4 AMOSTRA	24
4.5 GRUPOS DE PESQUISA	24
4.6 EXPERIMENTO	25
4.7 MÉTODO DE ANÁLISE	26
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	36
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICES	53
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

As úlceras cutâneas caracterizam-se por interrupção da continuidade da pele o que pode afetar desde tecidos superficiais, como a epiderme e derme, até aqueles mais profundos, dentre os quais estão os músculos e os ossos (ABBADÉ; LASTORIA, 2006). Representam uma importante intercorrência a saúde humana julgada pelo aspecto social, físico, psíquico e econômico decorrente do longo período de cura e dificuldade no processo de cicatrização (SHAHBAZIAN; YAZDANPANA; LATIFI, 2013; NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002). São vários os fatores que fazem das úlceras importantes intercorrências que apresentam grande dificuldade no processo de cicatrização tecidual, como principais destaca-se a presença de infecções, disfunções endoteliais e enfermidades metabólicas como o diabetes mellitus (KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012).

Nos pacientes diabéticos as feridas cutâneas aparecem como uma condição que afeta aproximadamente 220 milhões de pessoas por todo o mundo, e espera-se que esse valor atinja 336 milhões de pessoas no ano de 2030 (MATHERS; LONCAR, 2002). As úlceras diabéticas trazem complicações que afetam negativamente o paciente e frequentemente evoluem para à amputação de membros, além disso, aumentam a frequência de outras complicações como osteomielite e infecções (AMIN; DOUPIS, 2016). A presença de ulcerações afeta cerca de 15% dos pacientes com diabetes e são responsáveis por até 20% das hospitalizações (DUARTE; GONÇALVES, 2008).

Já as úlceras por pressão caracterizam-se como lesões nos tecidos da pele, podendo atingir tecidos ainda mais profundos, e sua etiologia está relacionada com forças externas de pressão e atrito em locais de proeminência óssea em contato com superfícies rígidas (macas e camas onde se encontram os pacientes), sua incidência é bastante elevada em países desenvolvidos perfazendo 14,3% e 18,7% dos pacientes internados (SAYAR et al., 2014) sendo que no Brasil a incidência encontra-se em entorno de 23,1% a 59,5% (ROGENSKI; KURCGANT, 2012).

A prevenção e tratamento eficaz das úlceras de pressão e em pacientes diabéticos caracterizam-se como ações de primordial importância, uma vez que se tratam de intercorrência que ocasionam dor, desconforto e diminuição da qualidade de vida do paciente e sua família. Além disso, a terapêutica das úlceras origina gastos ao paciente e as serviços de saúde pública

além de proporcionar acréscimo na carga de trabalho da equipe de saúde (COX, 2011; MIYAZAKI; CALIRI; SANTOS, 2014; SHAHIN; DASSEN; HALFENS, 2008).

Devido a esse tipo de disfunção, novas terapêuticas para as lesões de difícil cicatrização têm-se tornado necessárias e amplificam as novas pesquisas. Nesse contexto, tem-se destacado a laserterapia de baixa intensidade. A aplicação do laser sobre feridas cutâneas estimula o sistema imunológico e acelera o processo de reparo e cicatrização tecidual e associado a isso reduz os efeitos secundários da presença da ferida (DEMIR; BALAY; KIRNAP, 2004). Entre as células estimuladas pelo laser estão o macrófago, que resulta no aumento de fagocitose local, os linfócitos, agentes do sistema imunológico adaptativos responsáveis pela resposta mais precisa contra os agentes infecciosos, e os fibroblastos, responsáveis pela deposição de fibras de colágeno e reorganização da matriz extracelular (BASHARDOUST et al., 2010).

Também destacamos como componente capaz de estimular o processo de cicatrização tecidual a terapia com alta frequência (SÁ et al., 2009). Trata-se de um aparelho da eletroterapia que se utiliza de eletrodos de vidro contendo em seu interior, moléculas de um gás nobre específico ou apenas vácuo, opera em corrente alternada de alta voltagem e baixa amperagem (HIGA et al., 2007). O campo eletromagnético gerado pelos eletrodos promovem uma reação do oxigênio molecular atmosférico o que resulta na formação de ozônio (KORELO et al., 2013). Os principais efeitos fisiológicos causados pelo gerador de alta frequência advêm de sua capacidade de aumentar a temperatura tecidual promovendo assim incremento no metabolismo local e de sua capacidade de estimular a produção de ozônio caracterizado como um agente altamente antisséptico, antifúngico e antiviral (BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011; TRAVAGLI et al., 2010). Por esses efeitos o gerador de alta frequência é uma modalidade terapêutica que vem sendo estudada para possível utilização no manejo de úlceras de difícil cicatrização (KORELO et al., 2013).

O presente estudo, buscou trazer benefícios de caráter científico, econômico e social. Científico já que procurou evidências, com base em estudo experimental, sobre o uso de técnicas inovadoras em feridas de difícil cicatrização. Econômico, pois as técnicas utilizadas, laserterapia de baixa potência e gerador de alta frequência, são recursos de baixo custo, não invasivo, de fácil aquisição e manuseio, além de que ao acelerar o processo de cicatrização reduzirá os gastos no sistema de saúde e do próprio paciente. Social já que beneficiará o paciente, sua família e a sociedade de modo geral.

Com base no exposto o estudo analisou a hipótese de que efeito bioestimulador do laser de baixa potência associada a terapia com alta frequência promove modulação mais eficiente no processo de cicatrização tecidual. Com isso o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do laser de baixa potência de 660nm associado a terapêutica com alta frequência sobre o processo de cicatrização e reparo tecidual em úlceras cutâneas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito do laser de baixa potência de 660nm associado a terapêutica com alta frequência sobre o processo de cicatrização e reparo tecidual em úlceras cutâneas.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do laser de baixa potência na produção de colágeno no reparo tecidual em úlceras de ratos saudáveis.
- Aferir os efeitos da terapia com alta frequência na estimulação da produção de colágeno presentes no reparo tecidual em feridas de ratos saudáveis;
- Observar a evolução macroscópica das lesões, dos ratos saudáveis tratados com laser de baixa potência e terapia de alta frequência.
- Comparar os efeitos do laser de baixa potência no processo de cicatrização tecidual com os observados na terapia com alta frequência.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

3.1 ÚLCERAS CUTÂNEAS

As úlceras cutâneas caracterizam-se por interrupção da continuidade dos tecidos que compõem a pele podendo afetar desde tecidos superficiais, como a epiderme e derme, até aqueles mais profundos, atingindo os músculos e ossos. Representam uma importante intercorrência a saúde humana julgada pelo aspecto social e econômico devido ao longo tempo e dificuldade no processo de cicatrização (ABBADE; LASTORIA, 2006). Também traz consigo consequências psíquicas, sociais e financeiras para o paciente e sua família comprometendo sua qualidade de vida e dificultando sua recuperação (NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002).

A gravidade de uma úlcera depende de sua extensão superficial e profundidade, além disso, suas características físicas podem facilitar a ocorrência de complicações relacionadas a infecções como septicemia e osteomielite (NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002). O grau de uma úlcera varia de acordo com a profundidade dos tecidos atingidos sendo assim classificada: úlcera de grau 1, ocorre apenas em epiderme e apresenta como característica, eritema local; grau 2, envolve lesão em epiderme e derme sem destruir por completo a pele; grau 3, envolve a destruição completa das camadas da pele sem atingir tecidos mais profundos; grau 4, destruição completa da pele e tecidos mais profundos (ossos, músculos) (KIRKLAND-KHYN et al., 2019). A etiologia das úlceras é bastante variada e inclui traumas, compressão tecidual prolongada, alterações vasculares, doenças metabólicas e outras (NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002).

Alguns fatores influenciam negativamente na cicatrização de uma úlcera, entre eles, podemos citar: pressão contínua sobre o local, o que promove redução da circulação tecidual com conseqüente diminuição da nutrição e oxigenação das células, ambiente externo seco, que causa desidratação do tecido, traumatismos repetitivos no local o que promove a perda de tecido de granulação, diabetes mellitus, entre outros (HESS; SANTOS; SOUZA, 2002). Outro fator de importância clínica que afeta negativamente no processo de reparo tecidual é a presença de um foco infeccioso. Os microrganismos liberam substâncias tóxicas que promovem lesão tecidual contínua, morte celular e desnaturação de proteínas de colágeno que estimulam células

imunitárias a secretarem substâncias que prolongam ainda mais o processo inflamatório (CARVALHO; GOMES, 2005).

A cicatrização de uma úlcera engloba várias etapas e sofre influências positivas ou negativas de vários fatores. Em um primeiro momento temos a reação inflamatória com efeitos vasculares, quimiotaxia e presença de células imunitárias cujo foco é manter a homeostase local e iniciar o processo de reparação, após a reação inflamatória inicial ocorre o depósito de proteínas teciduais por células especializadas, em especial o fibroblastos, e reepitelização do tecido, e por fim a etapa final envolve a remodelação do tecido cicatricial recém formado com organização de proteínas e células (IRON, 2005).

3.2 REPARO TECIDUAL

Em virtude de ser abundante em células lábeis, o tecido epitelial encontra-se em elevada atividade mitótica com constante renovação celular, isso permite a eliminação de células superficiais antigas por novas derivadas de camadas mais profundas, tal mecanismo regenerativo permite a integridade fisiológica da pele e é importante no reparo tecidual em lesões de camadas superficiais (GONZALES; FUCHS 2017). No caso de lesão de camadas profundas, a regeneração tecidual dá lugar ao processo de cicatrização que por sua vez envolve mecanismos imunológicos mais complexos com formação de novo tecido não funcional, no entanto é importante para a manutenção da homeostasia e conseqüentemente da sobrevivência do organismo (TACON et al., 2011). Trata-se de um processo extremamente complexo que envolve sinais químicos, alterações vasomotoras, depósito de proteínas e remodelagem da matriz extracelular (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A cicatrização tecidual envolve três estágios principais: inflamação, proliferação e remodelação. Essas etapas não ocorrem em momentos definidos no tempo, e sim em momentos simultâneos com sobreposição dos eventos celulares na maioria dos casos (DUTTON, 2010).

A etapa inflamatória ocorre logo após a lesão e representa a resposta imediata do organismo ao estímulo nocivo (EMING; WYNN; MARTIN, 2017). No momento inicial da ocorrência da lesão ocorre vasoconstrição reflexa, ocasionada pelo tromboxano A, o que resulta em hipóxia tecidual, tal evento é um importante mecanismo de proteção que visa evitar a propagação de microrganismos na circulação sanguínea (CHEN, 2018), logo em seguida o vaso sanguíneo dilata aumentando o aporte de sangue e trazendo consigo células do sistema

imunitário (ROSA; FANTOZZI, 2013). Além das células imunitárias são liberadas no local, substâncias quimiotáticas capazes de atrair células do sistema imunológico para o local da lesão o que estimula ainda mais a resposta inflamatória (ALVES, 2012). O extravasamento de líquidos e células imunitárias no local da lesão caracteriza o exsudato inflamatório e tem como função remover as células mortas e microrganismos preparando o local para a reconstituição celular (GALLIOT et al., 2017). Devido à vasodilatação intensa e fatores associados, a inflamação, primeira etapa da cicatrização, é bem caracterizado pela presença dos sinais cardinais de edema, vermelhidão, calor, dor e perda funcional (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; DUTTON, 2010).

A segunda etapa do processo de cicatrização, estágio migratório e proliferativo, acontece simultaneamente ao processo inflamatório e é caracterizado por formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e tecido de granulação (DIPIETRO, 2016). Células especializadas na síntese de colágeno, fibroblastos, aumentam em número e apresentam-se metabolicamente ativos depositando matriz extracelular. Nessa etapa o tecido lesionado apresenta uma certa resistência à forças, tração e atrito dificultando a ocorrência de novas lesões no local (ROCHA; CAVALLIERI, 2007; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Conforme os macrófagos e outras células removem o tecido necrótico a nova matriz de colágeno e outras proteínas ocupam o local da lesão promovendo seu fechamento (KOTWAL; CHIEN, 2017). A moderada resistência oferecida pelo colágeno depositado favorece a integridade dos novos vasos formados oferecendo aspecto granular ao tecido. No final desse processo a lesão está completamente fechada e o tecido é predominantemente acelular abundante e repleto de proteínas da matriz (DUTTON, 2010).

A etapa final do processo de cicatrização, remodelação, caracteriza-se por substituição do tecido formado na fase de migração por um tecido cicatricial altamente resistente a nova lesão (TAKEO; LEE; ITO, 2015). A remodelação da matriz é executada por fibroblastos que depositam colágeno de forma mais ordenada as linhas de força promovendo maior resistência ao tecido. Nessa fase a cicatriz sobre contração e células epiteliais migram para as bordas da cicatriz multiplicando-se até que as margens opostas se encontrem (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; DUTTON, 2010).

3.3 LASER DE BAIXA POTENCIA

O termo laser, abreviatura para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz através da emissão estimulada de radiação), trata-se de um dispositivo capaz de gerar um feixe energético de radiação eletromagnética com três principais características que a distinguem das demais formas de emissão de energia, são elas: a monocromaticidade, propriedade advinda do fato dos fótons estarem em apenas uma frequência de onda; colimação, característica referente a propriedade em que todas as ondas eletromagnéticas são paralelas entre si, concentrando fortemente a energia; e coerência, propriedade caracterizada pelo fato de todos os feixes de ondas apresentarem as mesmas fases coincidindo crista com crista e vale com vale (KITCHEN, 2003).

O dispositivo que produz o raio laser é constituído por uma substância que ao ser estimulada por uma fonte de energia apresenta a propriedade de emitir um feixe de ondas eletromagnética. Podem se distinguir quanto a intensidade da energia liberada a presença de pelo menos três diferentes tipos de laser: o laser de alta potência, com efeitos térmicos e altamente abrasivo sendo por esse motivo utilizado em procedimentos cirúrgicos; laser de média potência, utilizado na remoção de cicatrizes, tatuagens e em processos de depilação; e o laser de baixa potência cujos efeitos terapêuticos e anti-inflamatórios são aproveitados para o tratamento conservador de uma ampla variedade de enfermidades (BARROS et al., 2008).

Os efeitos do laser de baixa intensidade advêm da conversão de energia luminosa, originada do dispositivo, em energia química que deposita-se nos tecidos biológicos e nos quais produz como consequência, efeitos primários, secundários e terapêuticos (GENOVESE 2000). Quando o feixe de laser interage com o tecido é capaz de promover uma série de reações, dentre elas estão o aumento do aporte de ATP produzido pela mitocôndria celular (LIMA et al., 2004), estimulação para a gênese de células do sistema imune, mastócitos e linfócitos, e de outras células corporais com melhora nos mecanismos de regeneração tecidual (ROCHA et al., 2007).

A aplicação do laser sobre feridas cutâneas estimula o sistema imunológico e acelera o processo de reparo e cicatrização tecidual e associado a isso reduz os efeitos secundários da presença da ferida (DEMIR; BALAY; KIRNAP, 2004). Entre as células estimuladas pelo laser estão o macrófago, com aumento de fagocitose, importante mecanismo na remoção dos tecidos necrosados e microrganismos, os linfócitos, agentes do sistema imunológico adaptativo, responsáveis pela resposta mais precisa contra os agentes infecciosos, e os fibroblastos, responsáveis pela deposição de fibras de colágeno e reorganização da matriz extracelular (BASHARDOUST et al., 2010)

A irradiação com laser de baixa potência possui efeitos bioceulares capazes de modular todo processo inflamatório. Em um primeiro momento age a nível celular aumentando o metabolismo por maior oferta energética, isso promove como consequência aumento na maturação de fibroblastos e células imunitárias, aumento da reabsorção de metabólitos teciduais, maior depósito de tecido de granulação e redução na liberação de mediadores inflamatórios acelerando o reparo e cicatrização tecidual (CHAVES et al., 2014). O laser também possui um efeito bioelétrico com melhora no funcionamento de proteínas de membranas responsáveis pela manutenção do potencial de repouso, entre elas a bomba de sódio e potássio (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005). Em consequência de sua modulação ao nível celular pode-se dizer que o laser apresenta efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes e analgésicos.

3.4 ALTA FREQUÊNCIA

O tratamento com alta frequência pode ser definido como um recurso eletroterapêutico cujas propriedades físicas caracterizam-no como uma corrente elétrica alternada com alta frequência (100.000 e 200.000 Hz) e baixa intensidade cuja amperagem encontra-se em torno de 100 mA (MARTINS et al., 2012). O aparelho gerador de alta frequência trata-se de um dispositivo ligado a corrente elétrica e conectado a um eletrodo especial de vidro. Tal eletrodo varia amplamente em seu formato e possui um gás em seu interior (em geral, gás nobre) (PEREIRA, 2007).

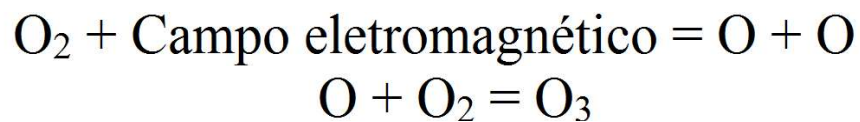
Quando conectado à rede elétrica o dispositivo gera uma corrente alternada que percorre o interior do eletrodo, o mesmo promove a ionização das partículas do gás presentes no interior do eletrodo de vidro, tal fenômeno induz a formação de um campo eletromagnético em torno do mesmo (MARTINS et al., 2012). Esse campo eletromagnético é de especial importância para a fisioterapia e estética uma vez que promove a quebra do oxigênio molecular em partículas de oxigênio iônico, esse por sua vez reage com outras partículas de oxigênio formando ozônio (BORGES; BORGES, 2006). A figura 1 representa esquematicamente a quebra do oxigênio molecular induzida pelo campo eletromagnético e posterior formação de ozônio decorrente da interação do oxigênio molecular com o oxigênio iônico livres na atmosfera.

O ozônio possui propriedades bactericidas e fungicidas (OLIVEIRA, 2011; HIGA et al., 2007). O ozônio formado pelo aparelho gerador de alta frequência estimula no tecido biológico

a liberação de citocinas e ativação linfocitária que promovem efeitos imunológicos sobre microrganismos (VELANO et al., 2001). Também é importante ressaltar a capacidade que o ozônio tem de atacar a membrana celular bacteriana alterando assim sua permeabilidade o que resulta em lise celular (BARROS; SANTOS; SANTOS, 2007).

Além disso, a alta frequência possui efeitos térmicos, uma vez que a agitação de partículas aumentam a temperatura tecidual acarretando dessa forma vasodilatação e aumento da irrigação sanguínea o que de forma secundária contribui com efeitos na modulação da inflamação, analgesia e reparo tecidual (MARTINS et al., 2012; OLIVEIRA, 2011).

Figura 1 – Equação demonstrando a formação de ozônio pela interação do campo eletromagnético com o oxigênio molecular atmosférico.



Fonte: Autor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESIGN DE ESTUDO

O presente estudo pode ser classificado como:

*Pesquisa experimental, uma vez que analisou o comportamento de uma amostra submetida a um experimento clínico.

*Quantitativo, no qual foram realizadas análises estatísticas com os dados numéricos obtidos do experimento realizado.

*Explicativo, já que buscou identificar os fatos responsáveis pelos fenômenos analisados.

*Transversal, pois foi executado em intervalo limitado de tempo.

4.2 LOCAL E PERÍODO

O estudo ocorreu nas dependências (laboratório e biotério) das seguintes Instituições de ensino superior:

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Endereço: R. Vera Paz - Salé, Santarém - PA, 68035-110.

Universidade do Estado do Pará (UEPA). Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399 - Aparecida, Santarém - PA, 68040-090.

Instituto Esperança de Ensino Superior (IESPS). Endereço: Rua Coaracy Nunes, 3315 - Caranazal, Santarém - PA, 68040-100.

A estudo teve duração aproximada de 8 meses abrangendo o intervalo de abril de 2018 a novembro de 2018.

4.3 PRINCÍPIOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo atual utilizou modelos animais em experimento, para tal o mesmo satisfaz os princípios, diretrizes e normas estabelecidas pelos órgãos de jurisdição competente. Foram obedecidas às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e lei federal que estabelece as normas para vivisseção em animais de laboratório (Lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979), também foi prioritário o seguimento da lei n. 9605/98 que estabelece as diretrizes sobre os crimes ambientais.

Para a execução da presente pesquisa foi realizado previamente um projeto de pesquisa o qual foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará, o mesmo foi aprovado sob o parecer N° **0720180035**. (Anexo 1).

4.4 AMOSTRA:

O estudo realizado envolveu a utilização de modelos experimentais totalizando 20 ratos Wistar com as seguintes características: ratos saudáveis, machos, idade superior 90 dias e massa corporal entre 250 e 300 gramas. A escolha dos animais seguiu o critério de suas vantagens biológicas: são animais de manejo simples, seu tamanho facilita o alojamento, sua alimentação é simples e de baixo custo, possuem elevada imunidade à infecções bacterianas, fúngicas e virais, além disso, proporcionam um modelo com semelhanças histológicas e clínicas com seres humanos (SANTOS et al., 2008). As vantagens citadas oferecem a possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais em locais limitados.

Os animais foram acomodados em gaiolas apropriadas feitas de polipropileno, suas mediadas eram de 41cmx34cmx16cm. Todas as gaiolas foram acolchoadas com maravalha, a qual foi trocada diariamente a fim de manter o ambiente adequadamente higienizado. Cada espaço alojou um total 5 animais durante todo o experimento.

Antes da realização do estudo propriamente dito os animais foram observados durante um intervalo de tempo mínimo de 15 dias. Esse período de observação foi necessário para promover a adequada adaptação dos animais ao ambiente do laboratório de experimento.

O laboratório do estudo teve acesso limitado apenas aos pesquisadores e aos técnicos responsáveis pela manutenção diária do laboratório. As condições climáticas foram rigidamente controladas com temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, remoção de partículas aéreas com o uso de exaustores e luzes alternadas com 12 horas de ambiente claro (luzes ligadas durante do dia) e 12 horas de ambiente escuro (luzes desligadas durante a noite). Os animais foram adequadamente nutridos com oferta de ração especial e água *ad libitum*.

4.5 GRUPOS DA PESQUISA

O estudo atual contou com 4 grupos de experimento, de acordo com o tratamento realizado, o qual continham 5 animais em cada. A opção da utilização de 5 animais em cada grupo buscou seguir as recomendações das Diretrizes Brasileiras que regem o uso de animais

em estudos científicos que estimula a redução do número de animais sem interferir nos objetivos da pesquisa, além do mais, grupos com 5 animais são comprovadamente suficientes para apresentarem resultados significativos na avaliação intragrupo e intergrupos em estudos experimentais (DAMY et al., 2010).

Cada grupo foi assim denominado:

1 - Grupo GC (Grupo Controle): Grupo submetido a lesão cutânea e no qual não foi realizado nenhum tratamento com eletrotermofototerapia.

2 - Grupo GL (Grupo Laser): Esse grupo recebeu a lesão cutânea e foi tratado com laser de baixa potência.

3 - Grupo GAL (Grupo Alta frequência): Recebeu a lesão e a foi tratado com o aparelho gerador de alta frequência.

4 – Grupo GL+Al (Grupo Laser associado a Alta frequência): Esse grupo recebeu a lesão e foi tratado simultaneamente com laser de baixa intensidade e gerador de alta frequência.

A eutanásia dos animais ocorreu no 11º dia após a lesão inicial. A escolha desse período deu-se em virtude do número de seções estabelecidas para a fisioterapia na cicatrização de feridas, perfazendo em torno de 10 seções como frequência diária, além disso, corresponde a um número de dias também utilizado em outros estudos envolvendo reparo tecidual em úlceras de ratos (CUNHA, et al., 2008; SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2019). Com isso o estudo atual objetivou aproximar os resultados do estudo com a prática diária do fisioterapeuta.

4.6 EXPERIMENTO

Anestesia

Para a anestesia dos animais foi utilizado o método de injeção intraperitoneal dos fármacos Ketamina a 10% (0,10ml/100g), cujas propriedades químicas promovem anestesia geral, e Xilazina a 2% (0,25 ml/100mg), com propriedades de relaxamento dos músculos esqueléticos promovendo dessa forma sedação e anestesia (ALMEIDA, 2008).

Produção da Lesão Traumática

Após o protocolo de anestesia, os ratos foram submetidos a lesões cutâneas padronizadas, para tanto inicialmente o animal foi posicionado decúbito ventral com membros estendidos e no local da futura lesão foi realizado tricotomia e posterior higienização com a substância antisséptica povidine-iodine (PVPI). A lesão realizada caracterizou-se com um formato circular

e para tanto foi utilizado um punch metálico de 5 mm de diâmetro em sua lamina cortante. Após o uso do punch foi removido um fragmento cutâneo até o ponto em que a lesão expôs a fáscia muscular dorsal.

As feridas foram higienizadas diariamente com soro fisiológico e ocluídas com gases estéreis. Uma manta de tecido estéril recobriu as gases afim de evitar contaminação da lesão por contato com o ambiente da gaiola.

Aplicação da Terapia

Com a lesão confeccionada, os animais foram submetidos a sessões de terapias diárias com laser de baixa potência e terapia com alta frequência de acordo com o grupo em que cada animal foi previamente alocado. Para a realização da terapia, sem a necessidade do uso de anestésicos, os animais foram imobilizados através de um dispositivo armadilha em forma de tubo de PVC de 4,5cm de diâmetro, tal dispositivo apresentava poros que permitiu a passagem do ar e um orifício para a exposição da lesão cutânea. Com isso, os animais realizaram a terapia sem a necessidade de imobilização manual.

No grupo submetido a laserterapia de baixa potência foi utilizada uma caneta com feixe de onda 660nm (luz vermelha) e potência 30mW. O aparelho utilizado foi da empresa Ibramed. Para a aplicação da técnica, a área da ferida foi dividida em quadrantes e os pontos de aplicação apresentaram distância angular de 90° um do outro na borda, e, também, um ponto no cerne da ferida, totalizando 5 pontos de aplicação. O método de aplicação do laser foi pontual, com a caneta do laser a uma distância aproximadamente de 2 mm de altura e perpendicular a ferida. A dose utilizada per fez de 4 J/cm², tempo de aplicação total foi de 1 minuto e 20 segundos.

Para a aplicação da terapia com alta frequência foi utilizado o aparelho gerador de alta frequência da marca Ibramed. A técnica utilizada correspondeu a de faiscamento com elétrodo do tipo cauterizador e alta intensidade, a amplitude utilizada foi de 80%, e o tempo de aplicação foi de 4 minutos, o elétrodo foi posicionado próximo o suficiente, no entanto não entrou em contato com a pele do rato.

4.7 MÉTODO DE ANÁLISE

Análise Fotogramétrica

A análise fotogramétrica consistiu na avaliação das características macroscópicas referentes as dimensões físicas da lesão, para esse estudo foi admitido o parâmetro de área que foi obtido por meio das imagens digitais retiradas durante o experimento diariamente.

A aquisição foi efetivada por meio de uma câmera fotográfica digital da Samsung®, modelo Samsung es95® de 16.2 megapixels. Todas as imagens foram obtidas sem a utilização do zoom, com uma distância padronizada de 25 cm das lesões em relação à câmera, o qual foi alcançada por meio da utilização de tripé. Durante a realização dos procedimentos, para a aquisição das imagens, foi utilizada, ao nível da lesão, um instrumento milimétrico que serviu como parâmetro para a calibração das medidas de área no momento da utilização do *software* para a análise de imagens.

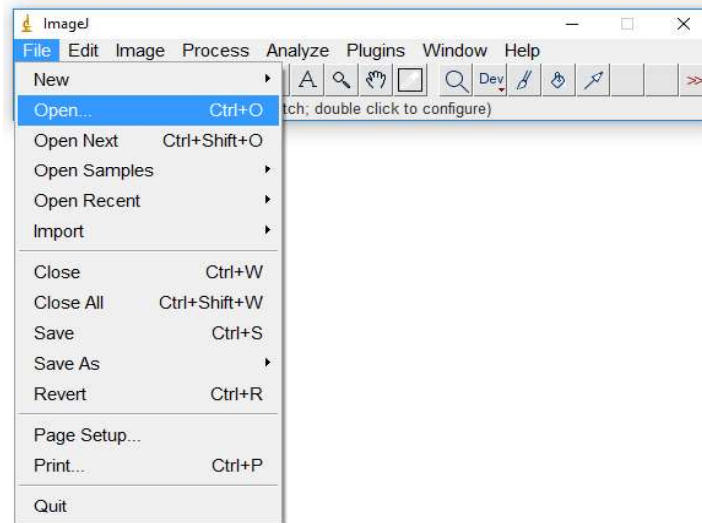
O *software* empregado para a realização do estudo, afim de mensurar as dimensões físicas da ferida, foi o *ImageJ*®, escolhido em virtude ao seu fácil manuseio, alta fidedignidade e por ser largamente utilizado em pesquisas científicas (MINATEL et al., 2009; KORELO, 2012; TARALLO, 2007).

Para compor cada análise foram obtidas 5 fotos por lesão em cada dia de experimento. Esse procedimento possibilitou a exclusão de fotos com falhas em aspectos fotográficos (foco, enquadramento, luminosidade, profundidade e reflexo) permitindo a escolhas das melhores fotos submetidas a análise do *software*. O programa escolhido permite o cálculo de diversos parâmetros numéricos de medidas como área, perímetro, diâmetro, distância entre as bordas. Para compor os resultados do presente estudo foi utilizado o parâmetro morfométrico de área, uma vez que vem sendo escolhido como uma forma da avaliação de feridas em grande parte dos estudos (MENDONÇA et al., 2006; FRANEK et al., 2004).

Para a realização dos procedimentos de análise de imagem foram realizados as seguintes etapas de forma sequenciada:

* Com o programa em execução inicia-se a pela busca dos arquivos utilizando os comandos File >>> Open (Figura 2).

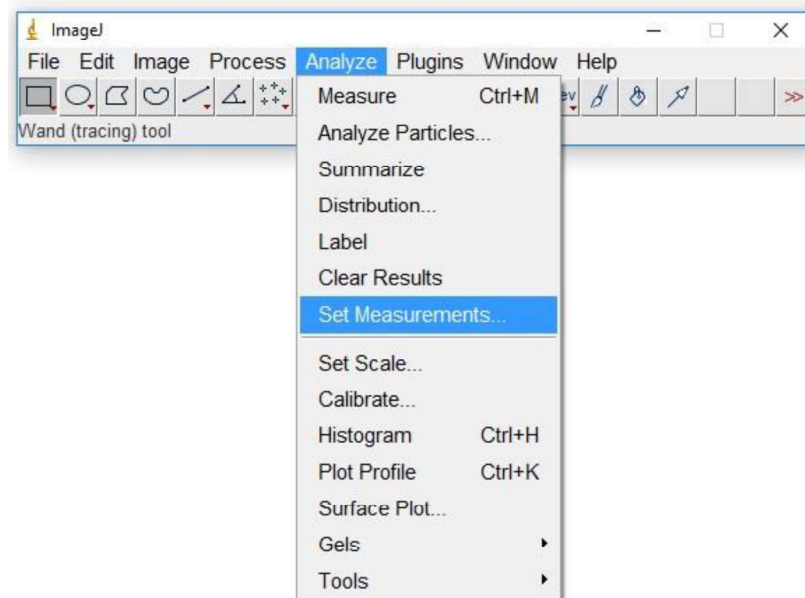
Figura 2 - Execução dos arquivos de imagens pelo software ImageJ.



Fonte: autor.

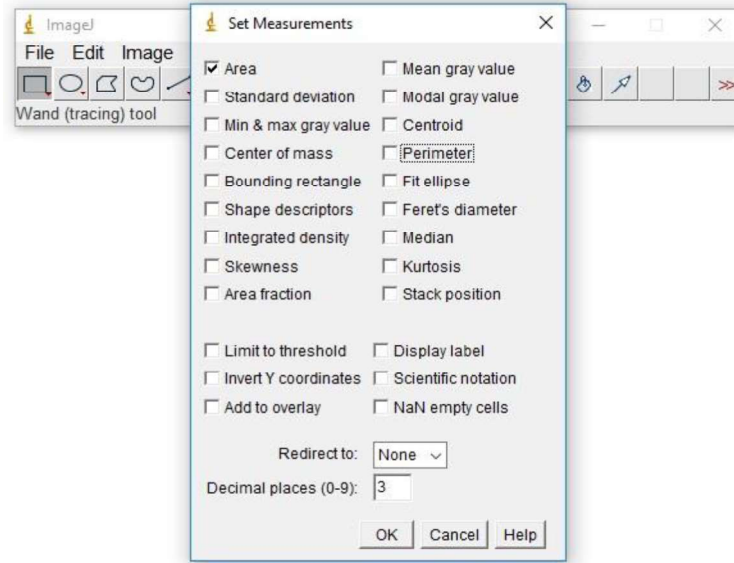
* Após a imagem ser processada foi necessária a escolha dos parâmetros a serem analisados pelo *software* (área). Para esse procedimento utiliza-se os seguintes comandos *Analyze >>> Set Measurements...* (Figura 3) Esse procedimento permite a exposição de uma nova janela a qual permite a escolha dos parâmetros desejados (Figura 4).

Figura 3 – Escolha dos parâmetros a serem avaliados por meio do software.



Fonte: autor

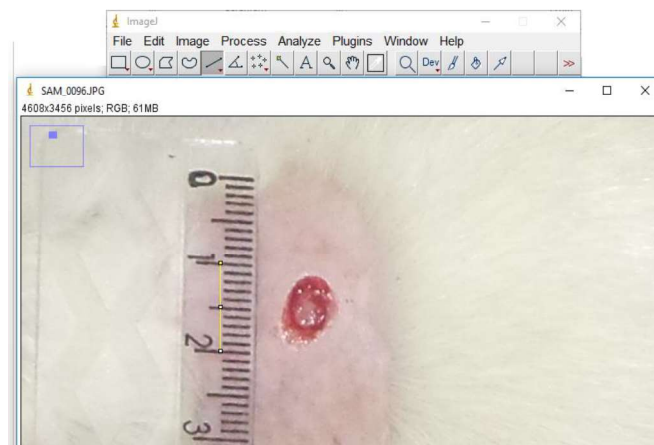
Figura 4 – Seleção do parâmetro de análise desejado no software.



Fonte: autor

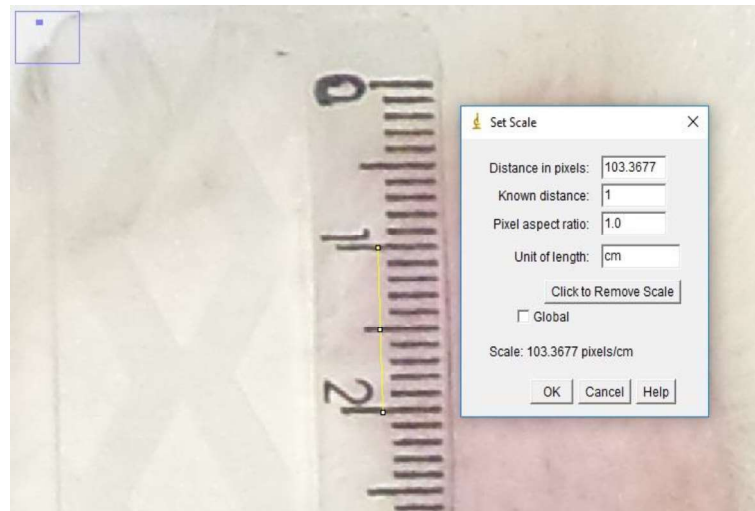
Para a medida com precisão foi necessária enquadrar próximo a cada lesão um instrumento milimétrico (régua) o qual serviu como referência para a calibração de cada imagem. Essa análise consistiu em delinear uma linha equivalente a um centímetro sobre a imagem da régua e posteriormente utilizar os seguintes comandos: *Analyze >>> Set Scale*. (Figura 5). Uma nova janela foi aberta permitindo a digitação no espaço “*Known Distance*” o valor “1” e no espaço “*Unit of Length*” a unidade de medida “cm” (Figura 6). Com esse procedimento cada medida numérica realizada na imagem utilizava como parâmetro a medida obtida por meio da régua.

Figura 5 - Calibração da imagem com o auxílio de um instrumento de medida.



Fonte: autor

Figura 6 – Conversão de valores de pixels para cm.



Fonte: autor


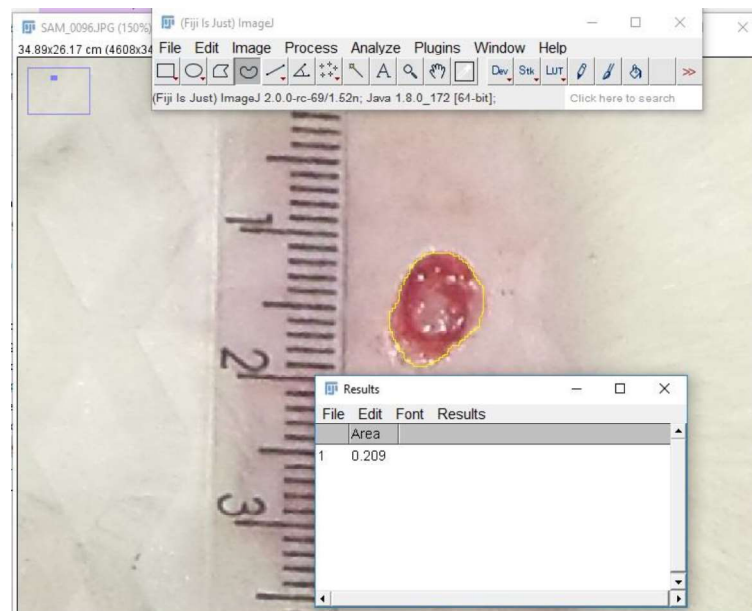
Com os valores padronizados iniciou-se a avaliação da área da ferida, para tal foi utilizado a ferramenta “*freehand selections*” (“”) a qual permitiu o delineamento das bordas da ferida de modo manual percorrendo a lesão com o mouse. Com o desenho estabelecido utilizava-se o comando *Analyze >>> Measure*, que apresentou em uma nova janela os valores obtidos da área das lesões (Figura 7).

Figura 7 – Delineamento da ferida e posterior análise de área.



Fonte: autor

Afim de evitar variações na análise morfológica das lesões apenas um avaliador treinado executou esses procedimentos, sendo que o mesmo o fez de forma uni cega em relação aos grupos de estudo.

Avaliação microscópica

Após a eutanásia uma amostra de tecido foi removida de cada animal, no local onde foi realizada a lesão e posterior tratamento. Todas as amostras foram fixadas em formol, sendo posteriormente desidratadas com banhos progressivos de álcool, e classificadas em xilol, por fim as amostras sofreram infiltração com parafina e foram montadas em blocos onde então foram processadas por meio de um micrótomo o que resultou em tecidos com 5 µm de espessura. Os materiais resultantes foram dispostos em laminas salinizadas.

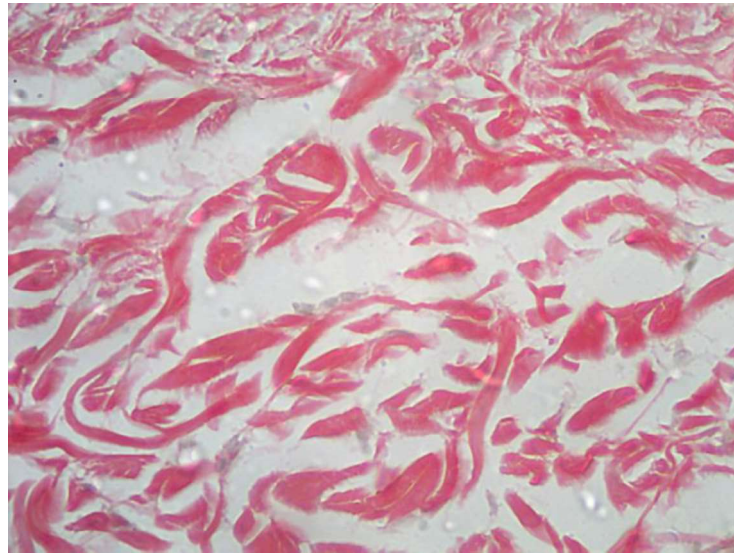
Coloração por Picro-Sirius Red

Para coloração de *Picro-Sirius Red* as lâminas foram desparafinizadas com xilol, sendo progressivamente hidratadas com álcool e água destilada. Os cortes histológicos permaneceram 15 minutos em solução de Sirius Red. Posteriormente os cortes foram lavados e contra-corados com hematoxilina de Harris, durante cinco minutos. Após esse procedimento as laminas foram desidratadas novamente com banhos progressivos de álcool e clarificadas em xilol. Após o procedimento descrito as laminas foram montadas.

A coloração de *Picro-Sirius Red* permite a quantificação de fibras colágenas e sua diferenciação em tipos. Ao ser observada em microscópio óptico, é possível diferenciar o colágeno em seus tipos pela diferença entre suas birrefringências e intensidade de cores, dessa forma a coloração de *Picro-Sirius Red* em geral, permite a diferenciação de colágeno do tipo 1 e do tipo 3, importantes marcadores do reparo tecidual (MONTES, 1996; RICH et al., 2005).

Para o estudo atual adotou-se o método quantitativo, já utilizado em estudos atuais (BEDOYA et al., 2016; MELO, 2017), de análise de imagens por meio da diferenciação da intensidade das cores. As laminas foram observadas em microscópio de luz polarizada associada com câmera fotográfica de 5 mp, em grande aumento (400x) (figura 8). Foram fotomicrografados 10 campos ao longo da região de lesão.

Figura 8 – Fotografia em grande aumento de uma lamina de tecido cutâneo corada em *Picro-Sirius Red*.

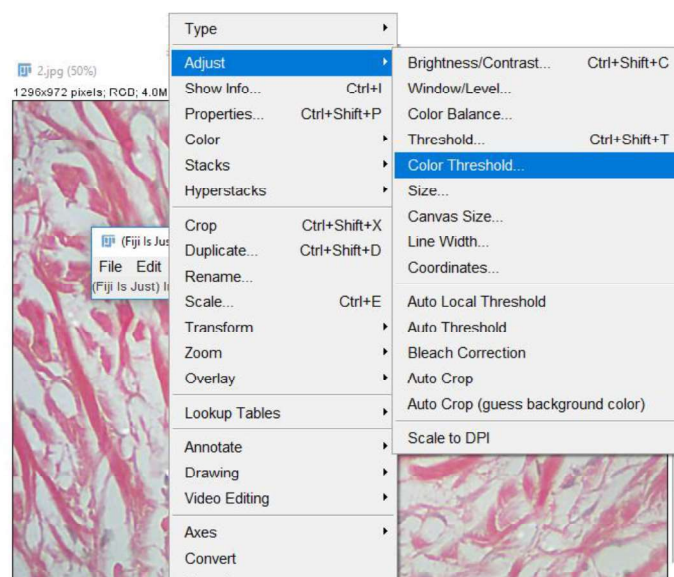


Fonte: Autor

As imagens foram processadas pelo *software* Image J versão completa (Fiji), seguindo as seguintes etapas:

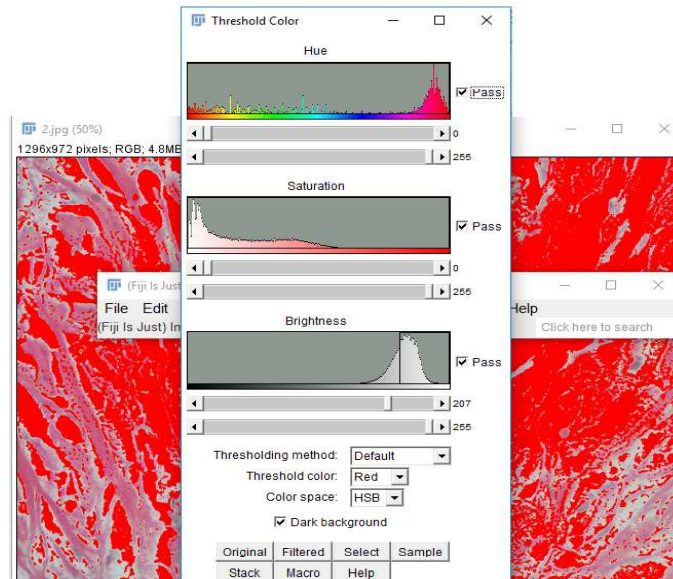
1. Carregamento da imagem pelo software (Figura 2) com o uso do comando *Open*
2. Em sequência a imagem foi processada pelos comandos *Image >>> Adjust >>> Color Threshold* (Figura 8). Tal processo permite a abertura de uma nova janela com os valores ajustáveis de *Hue*, *Saturation* e *Brightness* (Figura 9).

Figura 9 – Processamento da imagem da lâmina microscópica com a ferramenta *Color Threshold*.



Fonte: autor

Figura 10 – Processamento da imagem com a ferramenta *Color Threshold*: Ajuste dos valores.

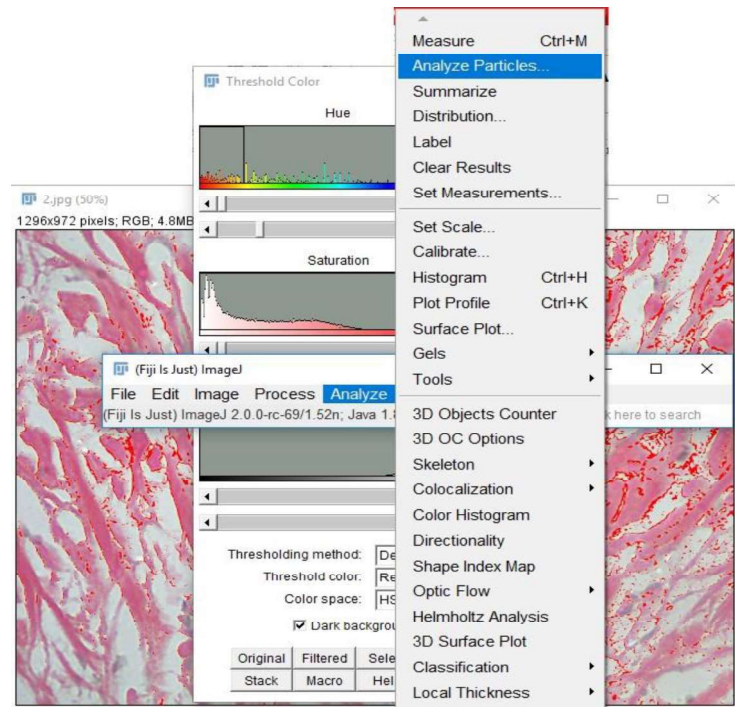


Fonte: autor

3. Para a obtenção dos valores percentuais de colágeno foram ajustados os seguintes valores: Para colágeno do tipo 1: *Hue*: 0-40, *Saturation*: 0-255 e *Brightness*: 5-225 captando a intensidade de cores vermelha; para colágeno tipo 3: *Hue*: 0-45-120, *Saturation*: 0-255 e *Brightness*: 5-225 captando a intensidade de cores verde.

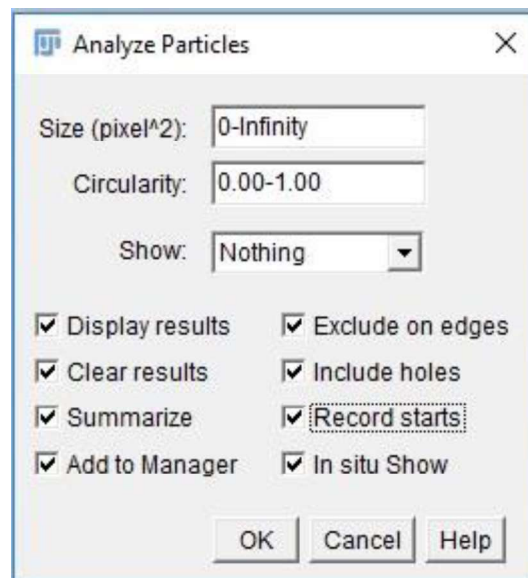
4. Após o procedimento de ajuste dos valores de *Hue*, *Saturation* e *Brightness* os dados foram processados pela análise de partículas automatizadas, para tanto foi necessário o uso dos seguintes comandos: *Analyze >>> Analyze Particles* (Figura 10). Esse procedimento permite a abertura de uma janela, no qual todos os comandos foram selecionados (Figura 11), com o ícone Ok uma nova janela com os valores de porcentagem de área ocupado por colágeno é aberta (Figura 12).

Figura 11 – Modelo esquemático para a abtenção dos valores percentuais de colageno por meio da análise de partículas automatizadas.



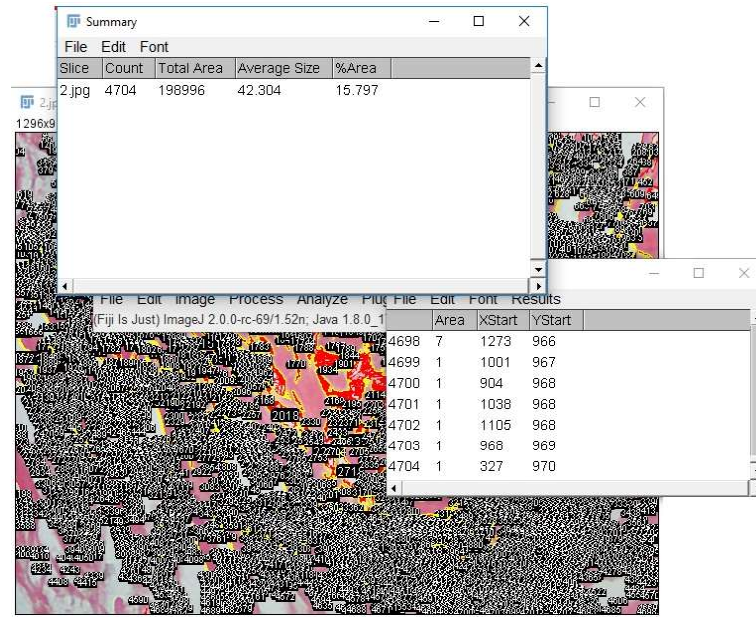
Fonte: autor

Figura 12 – Modelo esquemático para a abtenção dos valores percentuais de colageno por meio da análise de partículas automatizadas.



Fonte: autor

Figura 13 – Modelo esquemático para a abtenção dos valores percentuais de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas.



Fonte: autor

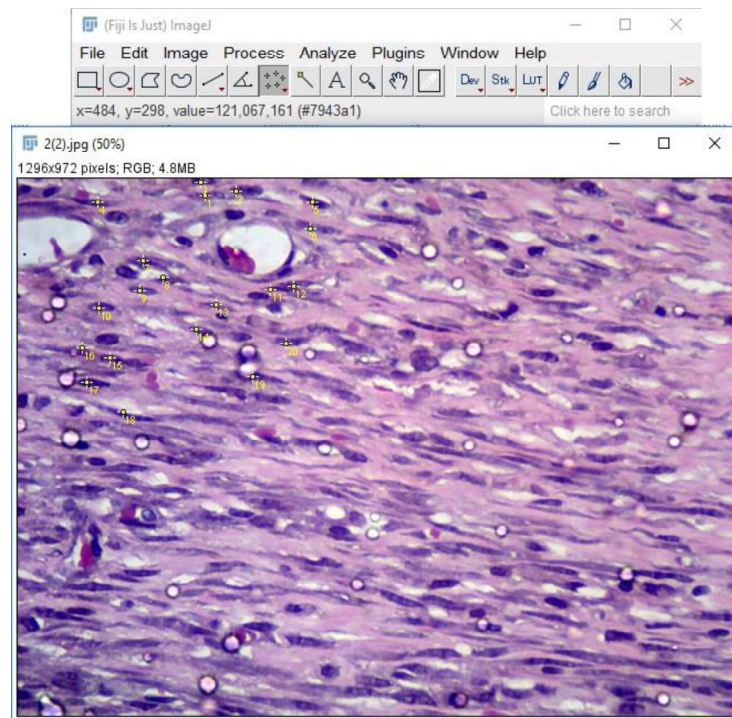
Coloração por Hematoxilina e Eosina

Na coloração por Hematoxilina e Eosina as lâminas foram desparafinizadas com xilol, sendo progressivamente hidratadas com álcool e água destilada. Em seguida o tecido foi corado em Hematoxilina de Mayer, com posterior coloração de Eosina-Floxina. Após o procedimento as lamínas foram novamente desidratadas com álcool e xilol. Para análise microscópica foram anotados de forma quantitativa a média do número total de fibroblastos em 10 campo de 400x.

A contagem de fibroblastos foi realizada com o auxílio do *software* Image J (versão completa: Fiji), seguindo as seguintes etapas:

1. Carregamento da imagem pelo software (Figura 2) com o uso do comando *Open*
2. Em sequência os fibroblastos encontrados foram marcados com o auxílio da ferramenta *Multi-point* (Figura 13). Os resultados foram expressos pela média do número total de fibroblastos marcados nos 10 campos de grande aumento (400x).

Figura 14 – Contagem de fibroblastos com o auxílio da ferramenta *Multi-point*.



Fonte: autor

4.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos no estudo atual foram tabulados em planilhas do software Excell (*Microsoft*® - EUA) e seu tratamento estatístico foi realizado com o auxílio *software* BioEstat 5.0. Para o presente estudo foi admitido o nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$ ou 5%).

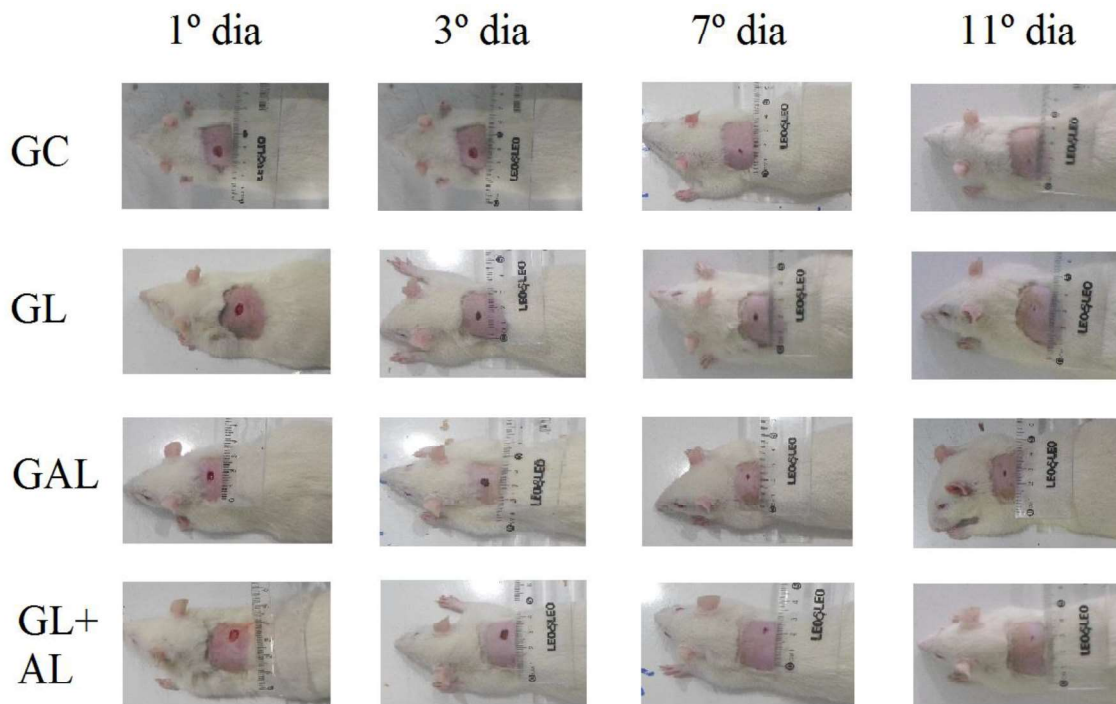
Em um primeiro momento todos os dados foram submetidos a análise de estatística descritiva com média e desvio padrão. Todos os dados também foram submetidos ao teste *shapiro wilk* para a avaliação de normalidade. Admitindo-se os valores de acordo com a curva normal foi realizada a análise inferencial intragrupo por meio do teste *t student* para amostras relacionadas. Na avaliação intergrupo foi utilizado o teste de variância *ANOVA 1* critério com pós teste de *Tukey*.

Os resultados do estudo atual foram apresentados em forma de tabelas e gráficos.

5. RESULTADOS

Na avaliação do reparo tecidual das feridas cutâneas por meio do parâmetro morfométrico de área foi possível observar que todos os grupos apresentaram redução da área no processo de cicatrização. A figura 15 apresenta a evolução da área de ferida em um rato wistar de cada grupo nos dias: 1, 3, 7 e 11.

Figura 15 – Evolução da área de ferida em um rato wistar de cada grupo nos dias: 1, 3, 7 e 11.



Fonte: autor.

O grupo GC apresentou 0.2102 ± 0.010 cm² de área no 1º dia com redução para 0.1748 ± 0.020 cm² no 3º dia, 0.0906 ± 0.017 cm² no 7º dia e 0.0130 ± 0.009 cm² no 11º dia. O grupo GL apresentou 0.2126 ± 0.011 cm² de área no 1º dia com redução para 0.1654 ± 0.043 cm² no 3º dia, 0.0754 ± 0.017 cm² no 7º dia e 0.0022 ± 0.002 cm² no 11º dia. O grupo GAL apresentou 0.2092 ± 0.018 cm² de área no 1º dia com aumento do valor para 0.2376 ± 0.020 cm² no 3º dia, e progressiva redução para 0.1456 ± 0.029 cm² no 7º dia e 0.0212 ± 0.007 cm² no 11º dia. O grupo GL+AL apresentou 0.2118 ± 0.010 cm² de área no 1º dia com aumento do valor para 0.2326 ± 0.021 cm² no 3º dia, e progressiva redução para 0.1194 ± 0.053 cm² no 7º dia e 0.0086 ± 0.007 cm² no 11º dia. Todos os dados comportaram-se de acordo com a linha normal

analisados pelo teste *shapiro wilk* ($p>0,05$). Os dados de área em média aritmética e desvio padrão (DP) são apresentados na Tabela 1.

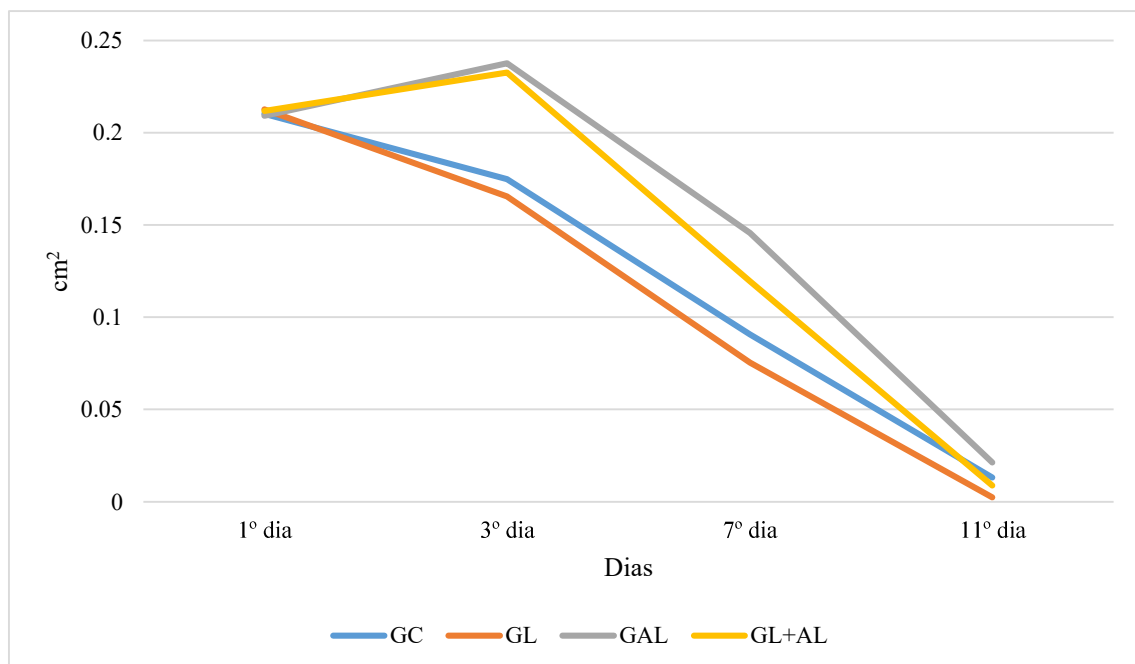
Tabela 1. Área das lesões ao longo dos dias de experimento com média e desvio padrão.

	1º Dia		3º Dia		7º Dia		11º Dia	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
GC	0.2102	0.010	0.1748	0.020	0.0906	0.017	0.0130	0.009
GL	0.2126	0.011	0.1654	0.043	0.0754	0.017	0.0022	0.002
GAL	0.2092	0.018	0.2376	0.020	0.1456	0.029	0.0212	0.007
GL+AL	0.2118	0.010	0.2326	0.021	0.1194	0.053	0.0086	0.007

DP: desvio padrão; CG: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência.

Através do gráfico 1 é possível analisar de forma visual a evolução da área da ferida nos diferentes grupos de tratamento.

Gráfico 1 – Variação da área da ferida ao longo dos dias de experimento nos diferentes grupos de tratamento.



CG: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência.

Fonte: autor.

Na avaliação intragrupo, foi possível observar redução significativa ($p<0,05$), por meio do teste *t de student*, na área da ferida tendo em vista o 1º dia e o 11º dia de tratamento. Os

dados de área, com média e DP do 1º dia e 11º de tratamento, assim como os resultados do teste *t de student*, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de área das feridas (cm²) cutâneas em ratos wistar com média e desvio padrão, teste *t de student* intragrupo antes e depois da terapia.

	1º dia		11º dia		<i>t de student</i>	
	Média	DP	Média	DP	<i>t</i>	<i>P</i>
GC	0.2102	0.010	0.0130	0.009	30.7450	0.0001*
GL	0.2126	0.011	0.0022	0.002	40.4466	0.0001*
GAL	0.2092	0.018	0.0212	0.007	24.8576	0.0001*
GL+AL	0.2118	0.010	0.0086	0.007	33.2922	0.0001*

GC: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência; GL+GAL: grupo laser associado a alta frequência; DP: desvio padrão; *resultado estatisticamente significativo para o teste *t de student*.

Com a finalidade de realizar análise inferencial entre os grupos após dos 11 dias de tratamento, foi utilizado o teste *ANOVA 1 critério* com pós teste *tukey*, foi possível observar de forma significativa ($p < 0,05$) redução de área do GL em comparação com o GAL e no GAL+GL em comparação com o GAL ($p < 0,01$). Os dados referentes a análise por meio do teste *tukey*, entre os grupos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância (*ANOVA 1 critério*), e teste *tukey*, entre os grupos após 11 dias de tratamento.

ANOVA	$F=6.7516$	$P < 0.05$
Tukey	Q	P
GCxGL	3.5226	ns
GCxGAL	2.6745	ns
GCxGL+AL	1.4416	ns
GLxGAL	6.1971	<0.01*
GLxGL+AL	2.0809	ns
GALxGL+AL	4.1162	<0.05*

GC: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência; GL+GAL: grupo laser associado a alta frequência; ns: não significativo; *resultado estatisticamente significativo para o teste *teste tukey*.

Na avaliação do reparo tecidual das feridas cutâneas por meio do parâmetro microscópico baseado em análise de colágeno do tipo 1, tipo 3 e número de fibroblastos foi possível observar que todos os dados comportaram-se de acordo com a linha normal analisados pelo teste *shapiro wilk* ($p > 0,05$).

O GC apresentou percentual médio de colágeno tipo I de $14.29\% \pm 5.72$ e percentual médio de colágeno tipo III de $15.60\% \pm 10.00$. O GL apresentou percentual médio de colágeno tipo I de $19.94\% \pm 6.37$ e percentual médio de colágeno tipo III de $17.47\% \pm 8.67$. O GAL apresentou percentual médio de colágeno tipo I de $19.56\% \pm 6.52$ e percentual médio de colágeno tipo III de $12.45\% \pm 8.02$. O GL+AL apresentou percentual médio de colágeno tipo I de $21.72\% \pm 5.16$ e percentual médio de colágeno tipo III de $23.79\% \pm 5.94$. Não houve diferença significativa entre os tipos de colágenos (teste *t de student*) em cada grupo analisado ($p > 0,05$). Na contagem de fibroblastos o grupo GC apresentou média de 136.92 ± 5.55 , o GL apresentou média de 136.04 ± 8.99 , o GAL apresentou média de 143.76 ± 8.77 e o GL+AL apresentou média de 144.68 ± 6.22 . A tabela 4 apresenta os valores de média e desvio padrão dos percentuais de colágeno tipo I e tipo III assim como os resultados da contagem de fibroblastos em cada grupo analisado.

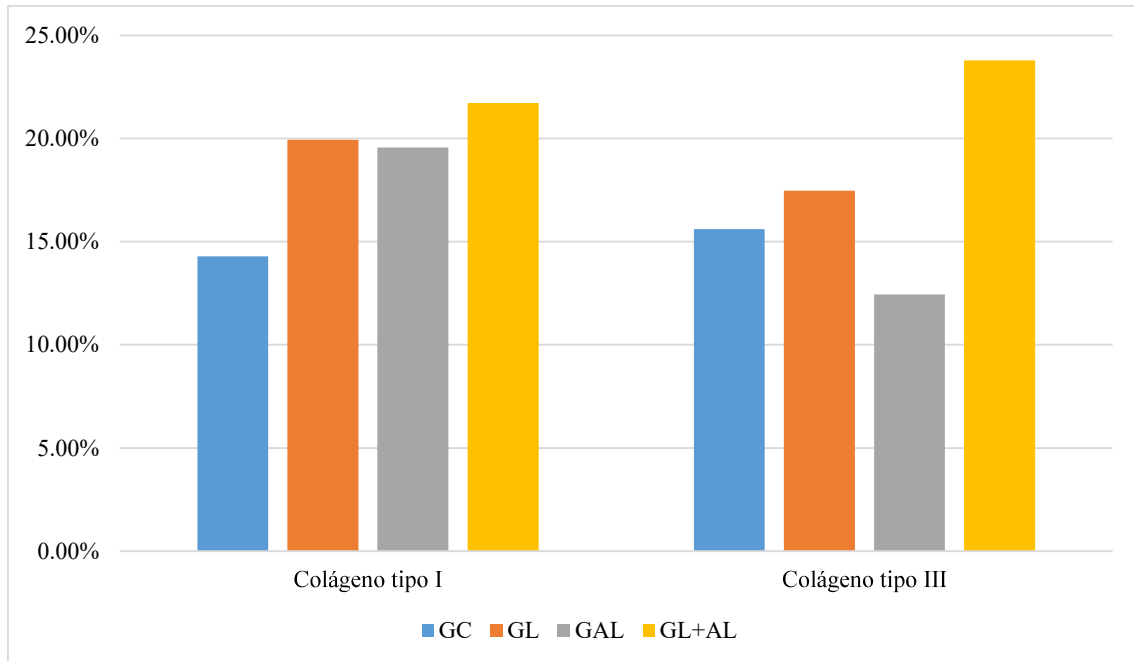
Tabela 4. Percentual de colágeno tipo I, tipo III e contagem de fibroblastos nos diferentes grupos de pesquisa.

	Colágeno tipo I		Colágeno tipo III		Fibroblastos	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
GC	14.29%	5.72	15.60%	10.00	136.92	5.55
GL	19.94%	6.37	17.47%	8.67	136.04	8.99
GAL	19.56%	6.52	12.45%	8.02	143.76	8.77
GL+AL	21.72%	5.16	23.79%	5.94	144.68	6.22

DP: desvio padrão; CG: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência.

O gráfico 2 permite melhor visualização nas diferenças dos percentuais médios de colágenos tipo I e tipo III entre os diferentes grupos de tratamento.

Gráfico 2 – diferença entre o percentual médio de colágeno entre os grupos de tratamento, teste ANOVA 1 critério.



CG: grupo controle; GL: grupo laser; GAL: grupo alta frequência.

Fonte: autor.

O teste *ANOVA 1 critério* foi utilizado para analisar possíveis diferenças na variância entre os grupos estudados com base nas variáveis colágeno do tipo I, colágeno do tipo III e número de fibroblastos. Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos de tratamento ($p > 0,05$). Os resultados do teste *ANOVA 1 critério* são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise de variância (*ANOVA 1 critério*), entre os grupos com base nas variáveis colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibroblastos.

	<i>F</i>	<i>P</i>
Colágeno tipo I	1.4362	$p > 0.05$
Colágeno tipo III	1.6634	$p > 0.05$
Fibroblastos	1.7818	$p > 0.05$

$p > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Os ratos da linhagem wistar são bastante utilizados em pesquisas clínicas uma vez que seus tecidos biológicos são bastante similares aos tecidos humanos. No entanto, as pequenas diferenças morfológicas e fisiológicas podem comprometer os resultados de pesquisa que visam futuramente envolver seres humanos. Dentre esses aspectos pode-se evidenciar que a pele de ratos wistar não desenvolve cicatrizes hipertróficas e seus vasos sanguíneos se distribuem de formas diferentes em relação a pele humana (SANTOS et al., 2018). No entanto, as similaridades entre a pele dos wistar com os seres humanos em celularidade, composição química e distribuição dos tipos de colágeno (VEIT et al., 2006) permite a obtenção de resultados importantes, além disso, o uso prévio em pesquisa de modelos animais é critério de segurança para futuros estudos com seres humanos (MÉTRAUX, 2016).

O reparo tecidual normal pode seguir o processo de cicatrização em tecidos permanentes ou o processo de regeneração em tecidos lábeis (TAKEO *et al.*, 2015). Muitos fatores podem afetar a velocidade e qualidade do reparo tecidual destacando-se a diabetes mellitus, presença de infecções, umidade, temperatura, traumas repetitivos e outros (SORG *et al.*, 2017). O presente estudo, afim de evitar os fatores que afetam o reparo tecidual utilizou-se de ratos saudáveis em condições adequadas de alimentação e higiene, além do controle rígido dos parâmetros ambientais. Após 10 dias de experimento a maior parte das lesões ainda não haviam completado o processo de reparo tecidual.

Com relação ao parâmetro de área da ferida os animais de todos os grupos apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) no último dia de tratamento em comparação com o primeiro. Um detalhe a ser observado (Tabela 1, Gráfico 1) é o fato da área da ferida dos grupos submetidos a terapia com alta frequência (GAL e GL+AL) apresentarem aumento logo nos primeiros dias de tratamento, supõe-se que tal evento deva-se a fatores relacionados a terapia, entre esses fatores, vale ressaltar que a alta frequência causa cauterização da ferida em virtude do faiscamento gerado em torno do eletrodo (KORELO et al., 2013) além disso, o gerador de alta frequência promove um aumento em temperatura tecidual (MARTINS et al., 2012), tal característica pode acentuar o processo inflamatório agudo nos primeiros dias de lesão, outro fator a ser destacado é a possível presença de radicais livres na ferida decorrentes do ozônio (LIN et al., 2011), por fim vale destacar os ruídos intensos gerados durante a aplicação da terapia que podem vim a resultar em estresse nos animais, isso pôde ser observado no presente

estudo uma vez que os animais do grupo de alta frequência apresentavam agitação física assim que o aparelho era ligado. No entanto, tal efeito só poderá ser confirmado em outros estudos que realizem medição dos níveis de cortisol no corpo do animal e da intensidade sonora emitida pelo aparelho.

Quando realizada comparação intergrupo foi possível observar que o GL apresentou menor valor médio de área ao final do experimento clínico, seguido pelos GL+AL, GC e GAL (Tabela 1). O GL obteve redução de área significativa ($p < 0.01$) ao final do tratamento em comparação com o GAL (Tabela 3). O GL+AL também obteve redução significativa ($p < 0,05$) de área quando comparado ao GAL (Tabela 3). Com base nesses achados em área supõe-se que o laser de baixa potência influencia positivamente no processo de reparo tecidual enquanto o de alta frequência isoladamente não apresenta esse efeito. De acordo com os estudos realizados (EISSA; SALIH, 2017; AMAROLI et al., 2019; TSUKA et al., 2019) o laser possui efeito bioestimulador em ferida por sua capacidade de induzir a mitocôndria celular a produzir ATP, tal efeito repercute em todas as fases de reparo, estimulando a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, liberação de substâncias quimiotáticas, estímulo à produção e deposição de colágeno e elastina.

Por outro lado, a terapia com alta frequência encontra-se em fase inicial de estudos. Porém, os poucos encontrados (KORELO *et al.*, 2013; SÁ et al., 2010) tem demonstrado efeitos positivos no processo de reparo tecidual, contradizendo o achado no estudo atual. Vale ressaltar que buscou-se inicialmente, nos estudos anteriores (KORELO *et al.*, 2013; SÁ et al., 2010), estímulo no processo de cicatrização em feridas com o aparelho de alta frequência em virtude de sua capacidade bactericida e fungicida em feridas crônicas, o que não foi foco do presente estudo que visou o estímulo ao reparo tecidual em feridas assépticas de ratos saudáveis no período agudo da inflamação tecidual.

Na avaliação microscópica foi utilizado como marcador do processo de reparo tecidual o percentual de área ocupada por colágeno, uma vez que trata-se da principal proteína constituinte na derme saudável dos animais, em especial colágeno tipo 1 (VEIT et al., 2006). Como pode ser observado (Tabela 4, gráfico 2) os grupos de tratamento apresentaram maiores depósitos de colágeno em comparação ao grupo controle, porém tal resultado não foi significativo (Tabela 5), o que é semelhante a maioria dos estudos realizados (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010; NITA et al., 2013). Com relação ao laser o maior percentual de colágeno pode ser explicado pelo processo de indução na produção acentuada de ATP que

resulta de forma secundária em acentuada mitose local com aumento no número de fibroblastos, tal características pôde ser observada no estudo atual com leve aumento no número de fibroblastos em comparação ao grupo controle (não significativo $p>0,05$), tal fenômeno sobre a celularidade de fibroblastos promove maior produção e depósito de colágeno, assim como sua reorganização (GIULIANI et al., 2009).

Um detalhe a ser observado é que embora a área das feridas dos ratos submetidos a terapia com alta frequência ter reduzido de forma menos acentuada que os demais grupos, o depósito de colágeno foi bem maior (não significativo, $p>0,05$), assim como o número de fibroblastos, sugere-se que tal efeito advenha do aumento de temperatura induzida pela terapia, o que incrementa o metabolismo estimulando a proliferação de fibroblastos e produção e depósito de colágeno (MARTINS et al., 2012; OLIVEIRA, 2011), também sugere-se que a partir do momento que a intensidade inflamatória reduz, por volta do 4 dia, os efeitos benéficos do alta frequência sobressaem-se. Não foram encontrados na literatura, estudos que demonstrem efeitos da terapia com alta frequência sobre a produção de colágeno. Quando observado a combinação de ambas as terapia o efeito sobre a produção de colágeno foi acentuado, com isso é possível sugerir uma soma nos efeitos individuais de cada terapia.

O presente estudo, demonstrou efeitos positivos no processo de reparo tecidual com o aparelho de laser de baixa potência isolado e combinado com o aparelho de alta frequência, porém não significativos quando comparados a ausência de tratamento, a possível explicação para tal ocorrência pode advim da amostra (n) reduzida utilizada no presente estudo. No entanto, em virtude dos afeitos controversos observados pelo uso do aparelho de alta frequência, novas dúvidas surgiram possibilitando dessa forma, a realização de novos estudos que visem analisar os efeitos da terapia com alta frequência na cicatrização em feridas sépticas e crônicas e de estudos que analisem a possibilidade que o ruído gerado pela alta frequência alterar o nível de estresse nos animais.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e análise da literatura existente conclui-se que:

- O laser de baixa potência é capaz de modular de forma eficiente o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos macroscópicos e microscópicos.
- O gerador de alta frequência não é capaz de modular de forma eficiente o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos macroscópicos.
- O gerador de alta frequência é capaz de modular de forma eficiente o processo de reparo em feridas cutâneas com base em aspectos microscópicos.
- O laser de baixa potência associado ao gerador de alta frequência apresentar bons resultados no processo de reparo tecidual, em nível macroscópico e microscópico.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L.P.F.; LASTORIA, S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.6, p.509-522, 2006.
- ALVES, A. N. **Influência da laserterapia de baixa potência na regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda**. Dissertação (Mestrado em Ciências das Raebilitação) – Universidade Nove de Julho. São Paulo, SP. 2012.
- AMIN, N.; DOUPIS, J. Diabetic foot disease: from the evaluation of the “foot at risk” to the novel diabetic ulcer treatment modalities. **World J Diabetes**, v.7, n.7, p.153-64, 2016.
- AMAROLI, A.; RAVERA, S.; BALDINI, F.; BENEDICENTI, S.; PANFOLI, I.; VERGANI, L. Photobiomodulation with 808-nm diode laser light promotes wound healing of human endothelial cells through increased reactive oxygen species production stimulating mitochondrial oxidative phosphorylation. **Lasers Med Sci**, v.34, n.3, p.495-504, 2019.
- BARROS, V.C.C; SANTOS, V.N.S; SANTOS, F.B. Tratamento de verruga ungueal causada por HPV com uso do gerador de alta frequência: relato de caso. **Rev Esp Fisioter.**, v.1, n.2, p.33-5, 2007.
- BARROS, F.C.; ANTUNES, S.A.; FIGUEREDO, C.M.S.; FISCHER, R.G. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. **R. Ci. méd. biol.**, v.7, n.1, p. 85-89, 2008.
- BASHARDOUST, T.S.; MACDERMID, J.C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a metaanalysis. **J Orthop Surg Res**, v.5, p. 1-13, 2010.
- BEDOYA, S.A.O.; CONCEIÇÃO, L.G.; VILORIA, M.I.V.; LOURES, F.H.; VALENTE, F.L.; AMORIM, R.L.; SILVA, F.F. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.1, p.147-154, 2016.
- BOCCI, V.A.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **J Transl Med.**, v.9, n.66, p. 1-11, 2011.
- BORGES, F.S.; BORGES, F.B.S. **Alta frequência**. In: Borges FS. Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte; 2006.
- BORGHARDTI, A.T.; PRADOI, T.N.; BICUDOI, S.D.S.; CASTROI, D.S.; BRINGUENTE, M.E.O. Úlcera por pressão em pacientes críticos: incidência e fatores associados. **Rev Bras Enferm.**, v.69, n.3, p. 460-7, 2016
- BOURGUIGNON-FILHO, A.M. Utilização do laser no processo de cicatrização tecidual: revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilo-facial**, v.46, n.1, p.37-43, 2005.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.**, v.117, p.12S-34S, 2006.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg.**, v.117, n.7, p.1e-S-32e-S, 2006.

BUSNARDO, V.L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev bras fisioter.**, v.14, n.1, p.45-51, 2010

CARVALHO, D.V.; GOMES, F.S.L. Infecção hospitalar: um obstáculo à cicatrização de feridas. **Nursing (São Paulo)**, v.89, n.8, p. 468-74, Out. 2005.

CHAVES, M.E.A.; ARAÚJO, A.R.; PIANCASTELLI, A.C.C.; PINOTTI, M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An Bras Dermatol.**, v.89, n.4, p.616–623, 2014.

CHEN, H. Role of thromboxane A₂ signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.134, p.32-37, 2018.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – **COBEA**. Disponível em:<
http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/35979#.Ww651Sin_IU. Acesso em: 28 de Maio de 2018.

COX, J. Predictors of pressure ulcer in adult critical care patients. **Am J Crit Care.**, v.20, n.5, p. 364-74, 2011.

CUNHA, N.B.; MOESCH, J; MALLMANN, J.S.; CIENA, A.P.; BERTOLINI, G. R.F. Uso do Laser, 670 nm, no Quadro Álgico de Ratos Submetidos à Modelo Experimental de Cialgia. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n.2, p.115-118, 2008.

DAMY, S.B.; CAMARGO, Roberto Souza; CHAMMAS, Rober; FIGUEIREDO, Luiz Francisco Poli. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 56, n. 1, p: 103-111, 2010.

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

DIPIETRO, L.A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **J Leukoc Biol.**, v.100, n.5, p:979-984, 2016.

DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé diabético. **Angiologia e Cirurgia Vascul**, v.7, n.2, p.65-79, 2011.

DUTTON, Mark. **Fisioterapia ortopédica: exame,avaliação e intervenção** - 2. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2010.

EISSA, M.; SALIH, W.H.M. The influence of low-intensity He-Ne laser on the wound healing in diabetic rats. **Lasers Med Sci.**, v.32, n.6, p.1261-1267, 2017.

EMING, S.A.; WYNN, T.A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v.356, n.6342, p:1026-1030, 2017.

FERRARI, R.J.; PICCHI, L.D.; BOTELHO, A.P.; MINAMOTO, V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Fisioter Mov.**, v.18, n.2, p.63-71, 2005.

FERREIRA, B.S.; SILVA, W.F.; SOUZA, J.; MORINI, A.C. Efeitos da carboxiterapia na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev. Pesqui. Fisioter.*, v.9, n.1, p:28-36, 2019

FRANEK, A.; CHMIELEWSKA, D.; BRZEZINSKA-WCISLO, L.; SLEZAK, A.; BLASZCZAK, E. Application of various power densities of ultrasound in the treatment of leg ulcers. **J Dermatol Treat.**, v.15, n.6, p.:379-86, 2004.

GALLIOT, B.; CRESCENZI, M.; JACINTO, A.; TAJBAKSHH, S. Trends in tissue repair and regeneration. **Development**, v.144, n.3, p.357-364.

GENOVESE, J.W. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia.** Sao Paulo: Lovise Ltda; 2000. 175p.

GIULIANI, A.; LORENZINI, L.; GALLAMINI, M.; MASSELLA, A.; GIARDINO, L.; CALZÀ L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability. **BMC Complement Altern Med.**, v.9, n.8, 2009.

GONZALES K.; FUCHS E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. **Dev Cell.**, v.43, n.4:387-401, 2017.

HESS, C.T.; SANTOS, M.A.B.; SOUZA, S.R. **Tratamento de Feridas e Úlceras.** Rio de Janeiro: Reichmann & Afonso editoras, 2002. 226p.

HIGA, D.R.; CESE, P.C; FALCÃO, R.M.M.; CESE, A.C.; CHANG, M.R.; BORGES, F.S. et al. Efeito do gerador de alta frequência sobre cultura de candida tropicalis. **R Esp Fisiot.**, v.1, n.1, p.1-8, 2007.

IRION, G. Feridas: **Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em cores.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 390p.

KIRKLAND-KHYN, H.; TELETEN, O.; JOSEPH, R.; MAGUINA, P. A. Descriptive Study of Hospital- and Community-acquired Pressure Ulcers/Injuries. **Wound Manag Prev.**, v.65, n.2, p.14-19, 2019.

KITCHEN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências - 2.ed. - Barueri, SP: Manole, 2003.**

KOLLURU, G.K.; BIR, S.C.; KEVIL, C.G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. **International journal of vascular medicine**, v. 2012, 2012.

KORELO, R.I.G.; OLIVEIRA, J.J.J.; SOUZA, R.S.A.; HULLEK, R.F.; FERNANDES, L.C. High frequency generator as treatment in scar pressure ulcers: pilot study. **Fisioter. Mov.**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 715-724, 2013.

KOTWAL, G.J.; CHIEN, S. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. **Results Probl Cell Differ.**, v.62, p.353-364, 2017.

LIMA, M. A.; GARCIA, V.G., OKAMOTO, T. Reparação de feridas cutâneas retardadas submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade associado ou não a droga fotossensibilizadora - Estudo histológico em ratos. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília, Marília, 2004.

LIN, Q.; CHEN, H.; LU, C.; WANG, B.; ZHANG, Y.; HE, X. Effects of ozone on sciatic nerve in rat. **Interv Neuroradiol.**, v.17, p.281-5, 2011.

MARCOM, K.; ANDRE, E. S. Estudo dos Efeitos do Laser Gaalinp no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. **Revista Fisiobrasil**, v.9, n.74, p. 08-13, 2005.

MARTINS, A.; SILVA, J.T.; GRACIOLA1, L.; FRÉZ, A.R.; RUARO, J.A.; MARQUETTI, M.G.K. Efeito bactericida do gerador de alta frequência na cultura de *Staphylococcus aureus*. **Fisioter Pesq.**, v.19, n.2, p.153-7, 2012.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med.**, v.3, n.11, p.442, 2006

MELO, Gabriela Haro de. Análise fractal na caracterização de colágenos tipos I e III em feridas dérmicas tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas. 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2017.

MENDONÇA, A.C.; FERREIRA, A.S.; BARBIERI, C.H.; THOMAZINE, J.A.; MAZZER, N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta ortop. Bras.**, v.14, n.3, p.152-157, 2006.

MENDONÇA, J. R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MÉTRAUX, A. On Some Issues of Human-Animal Studies: An Introduction. **Sci Context**, v.29, n.1, p.1-10, 2016.

MINATEL, D.G. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg

ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med.**, v.4, n.1, p.433-41, 2009.

MIYAZAKI, M.Y.; CALIRI, M.H.L.; SANTOS, C.B. Knowledge on pressure ulcer prevention among nursing professionals. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v.18, n.6, p.1203-11, 2014.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biol. Int.**, v.20, p.15-27, 1996.

NITA, A.C.; ORZAN, O.A.; FILLIPESCU, M.; JIANU, D. Fat Graft, Laser CO2 and Platelet-Rich-Plasma Synergy in Scars Treatment. **J Med Life**, v.6, n.4, p.430-433, 2013.

NOGUEIRA, P.C.; CALIRI, M.H.L.; SANTOS, C.B. Fatores de risco e medidas preventivas para úlcera de pressão no lesado medular: Experiência da equipe de enfermagem do HCFMRP-USP. **Revista Medicina**, n.35, p.14-23, 2002.

OLIVEIRA, L.M.N. Utilização do ozônio através do aparelho de alta frequência no tratamento da úlcera de pressão. **Rev Bras Ciênc Saúde**, v.9, n.30, p.41-6. 2011.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

PEREIRA, F. **Eletroterapia sem mistérios: aplicações em estética facial e corporal**. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.

RICH, L.; WHITTAKER, P.C.; PICROSIRIUS, R.S. A polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz J Morphol Sci.**, v.22, p.97-104, 2005.

ROCHA JUNIOR, A.M.; VIEIRA, B.J.; ANDRADE, L.C.F; MONTEIRO, A. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **J Vasc Bras**. v.6, p. 258-66, 2007.

ROSA, A.C.; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **Br J Pharmacol**, v.170, n.1, p.38-45, 2013.

ROCHA, R. S. B.; CAVALLIERI, A. G. Lesão, Plasticidade e Reabilitação do Sistema Muscular. **Revista brasileira Ciência e Movimento**, v. 15, n. 2, 2007.

ROGENSKI, N.M.B.; KURCGANT, P. The incidence of pressure ulcers after the implementation of a prevention protocol. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v. 20, n.2, p.331-336, 2012.

SÁ, H.P.; NUNES, H.M.; SANTO, L.A.E; OLIVEIRA, G.C.S.; SILVA, J.M.N.; CARVALHO, K.C. et al. Estudo comparativo da ação do laser GaAlInP e do gerador de alta frequência no tratamento de feridas cutâneas em ratos: estudo experimental. **ConScientiae saúde**, v. 9, n. 3, p. 360-6, 2010.

SANTOS, M.F.S.; CZECZKO, N.G.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS-FILHO, J.M.; ALENCAR, B.L.F; MALAFAIA, O. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras.**, v.21, n.3, p.2-7, 2008.

SAYAR, S.; TURGUT, S.; DOGAN, H.; EKICI, A.; YURTSEVER, S.; DEMIRKAN, F. et al. Incidence of pressure ulcers in intensive care unit patients at risk according to the Waterlow scale and factors influencing the development of pressure ulcers. **J Clin Nurs.**, v.18, n.5, p.765-74, 2014.

SHAHBAZIAN H, YAZDANPANAHL, LATIFI SM. Risk assessment of patients with diabetes for foot ulcers according to risk classification consensus of International Working Group on Diabetic Foot (IWGDF). **Pak J Med Sci.**, v.29, p:730-734, 2013.

SHAHIN, E.S.; DASSEN, T.; HALFENS, R.J.E. Pressure ulcer prevalence and incidence in intensive care patients: a literature review. **Nurs Crit Care**, v.13, n.2, p.71-9, 2008.

SILVA, T.S.; MENDES, F.; ALVES, Â.M. P.; ALVES, É.P.B.; BERTOLINI, G.R.F. Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência. **R. bras. Bioci.**, v. 8, n. 3, p. 264-267, 2010.

SOUSA, Raquel Gomes de; BATISTA, Keila de Nazaré Madureira. Laser therapy in wound healing associated with diabetes mellitus - Review. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 489-493, 2016.

TAKEO, M.; LEE, W., ITO, M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v.5, n.1, 2015.

TACON K. C. B. *et al.*, Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 373 – 378, 2011.

TOMAZONI, S. S. **Efeito da simvastatina na lesão induzida por estiramento passivo em ratos.** Dissertação (Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BOCCI, V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. **Mediators Inflamm.**, p. 1-9, 2010.

TSUKA, Y.; KUNIMATSU, R.; GUNJI, H.; NAKAJIMA, K.; KIMURA, A.; HIRAKI, T.; NAKATANI, A.; TANIMOTO, K. Effects of Nd:YAG low-level laser irradiation on cultured human osteoblasts migration and ATPproduction: in vitro study. **Lasers Med Sci.**, v.34, n.1, p.55-60, 2019.

VEIT, G.; KOBBE, B.; KEENE, D.R.; PAULSSON, M.; KOCH, M.; WAGENER, R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. **J Biol Chem**, v.281, n.6, p. 3494-504, 2006.

VELANO, H.E.; NASCIMENTO, L.C.; BARROS, L.M.; PANZERI, H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesq Odontol Bras.**, v.15, n.1, p:18-22, 2001.

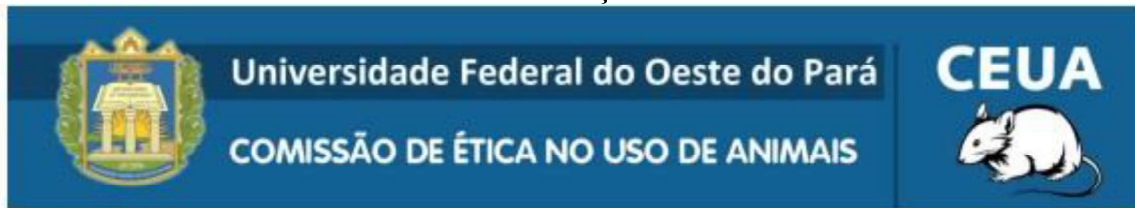
APÊNDICE 1 – ACEITE DO ORIENTADOR**DECLARAÇÃO**

Eu, Adriana Caroprezo Morini, declaro aceitar a orientação do trabalho intitulado **“EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA E ALTA FREQUÊNCIA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS”**, estando sob minha orientação o pesquisador assistente: Wanderson Fernandes Silva, declarando ter total conhecimento do conteúdo desta pesquisa, para o qual dou meu aceite.

Santarém - Pará, 04 de junho de 2017.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, is centered on the page.

Assinatura

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo Nº 0720180035, intitulado **Efeito da associação da terapia com laser de baixa potência e alta frequência no processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos.**, sob a responsabilidade de **adriana caroprez morini**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 0720180035, entitled "**Efeito da associação da terapia com laser de baixa potência e alta frequência no processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos.**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 04/01/2019

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>