

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBELE TERESINHA DIAS RIBEIRO

EFEITOS DA LASERTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS EM
RATOS UTILIZANDO MODELOS DE ANIMAIS COM INSUFICIÊNCIA ARTERIAL E
DIABETES *MELLITUS*

CURITIBA

2019

CIBELE TERESINHA DIAS RIBEIRO

EFEITOS DA LASERTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS EM
RATOS UTILIZANDO MODELOS DE ANIMAIS COM INSUFICIÊNCIA ARTERIAL E
DIABETES *MELLITUS*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Fisiologia, no curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

R484e Ribeiro, Cibele Teresinha Dias
Efeitos da laserterapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos
utilizando modelos de animais com insuficiência arterial e diabetes mellitus
[recurso eletrônico] / Cibele Teresinha Dias Ribeiro. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, 2019.

Orientador: Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça.

1. Diabetes. 2. Cicatrização de ferimentos. 3. Aterosclerose. 4. Úlceras. 5.
Lasers. I. Universidade Federal do Paraná. II. Fogaça, Rosalvo Tadeu
Hochmuller. III. Título.

CDD: 621.366

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 0/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de CIBELE TERESINHA DIAS RIBEIRO intitulada: Efeitos da laserterapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos utilizando modelos de animais com insuficiência arterial e diabetes mellitus., após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Março de 2019.

ROSALVO TADEU HOCHMULLER FOGAÇA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TALITA GIANNELLO GNOATO ZOTZ
Avaliador Externo

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Avaliador Interno (UFPR)

LUCINEIA DE FATIMA CHASKO
Avaliador Externo

Dedico esse trabalho ao meu esposo Fernando e a minha filha Bianca

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e me mostrar o caminho certo nas horas incertas.

Ao meu esposo, professor, companheiro, Fernando. Obrigada por compartilhar todo o seu conhecimento sempre com muita calma e paciência. E mostrar que devemos caminhar sempre em frente em busca dos nossos objetivos. Minha eterna admiração à sua maneira de ensinar!!

A minha filha Bianca, minha sempre princesa e razão da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado sempre, seja no Laboratório ou em casa fazendo tarefas comigo quando precisava estar no computador estudando.

Aos meus pais, por todo o carinho, apoio em todos os momentos da minha vida, pelo que eu sou hoje. Obrigada por estarem presentes nos momentos mais especiais e importantes da minha vida.

As minhas irmãs, Danielle e Franciele que sempre estiveram ao meu lado, o nosso amor e cumplicidade vencem qualquer distância.

Ao meu orientador, Rosalvo Fogaça, exemplo de dedicação ao ensino e aos alunos, obrigada pelos seus ensinamentos.

A Diego, fiquei muito feliz em poder dividir esses anos de estudo ao seu lado, Mestrado e Doutorado, e conhecer essa pessoa que sempre está pronta a ajudar, obrigada por tudo.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular e em especial a vocês, que me ajudaram durante o estudo: Andrielle, Henrique, Gislaine, Marcelo, Franciele, Cláudio, Edilaine, João, seja apenas com trocas de caixas ou dividindo momentos juntos em realizações de experimentos, rindo ou chorando após levar umas bronquinhas, e o melhor, tenho certeza que aprendemos muito com os nossos próprios erros no Lab (estouro de válvula de gás, receitas novas de gelatina, queima de equipamentos).

A todos os professores do departamento de Fisiologia e do programa de Pós-Graduação, e em especial a Profa. Ilana e Profa. Fabíola pelas conversas de corredor, por todo apoio e incentivo.

A Profa. Flavia do Departamento de Biologia Celular e Molecular por ceder seu microscópio para que eu pudesse realizar todo o trabalho de captação de imagens histológicas.

A Lis e ao Israel, do CTAF da UFPR, a ajuda de vocês foi essencial para que eu pudesse registrar as lâminas de histologia e fazer a quantificação de todas as imagens.

Às professoras Beata Wolska e Shamim Chowdhury, da Universidade de Illinois em Chicago, por terem cedido o espaço e colaborado com os experimentos de ecografia.

As pessoas especiais que tive a oportunidade de conhecer durante a realização do Doutorado, Lúcia, Helena, Ana Gabriele, aos integrantes do atual rancho folclórico Vila dos Pinheirais.

Ao suporte financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao NUPEN – DMC pelo empréstimo do equipamento emissor de laser para realização dos experimentos.

E a todos que, de alguma forma fizeram parte da minha caminhada, a minha sincera gratidão!!

“E O QUE IMPORTA NÃO É O QUE VOCE TEM NA VIDA, MAS QUEM VOCÊ TEM NA VIDA” (WILLIAM SHAKESPEARE).

RESUMO

A Doença Arterial Periférica (DAP) caracteriza-se por um processo crônico e obstrutivo ocasionado pela presença da aterosclerose onde ocorre redução do fluxo sanguíneo para os membros inferiores. Está associada a outros distúrbios como o diabetes *mellitus*. As úlceras cutâneas de origem arterial surgem devido à falta de suprimento sanguíneo arterial. Um dos recursos terapêuticos que vem sendo sugerido como parte integrante do tratamento das úlceras é o Laser de Baixa Intensidade (LBI). Sendo assim, o estudo teve os seguintes objetivos: 1) Avaliar a eficiência do modelo de insuficiência arterial pela análise do fluxo sanguíneo da artéria femoral após a cirurgia de oclusão total da artéria femoral (OAF) em ratos; 2) Avaliar os efeitos da aplicação do Laser de Baixa Intensidade na cicatrização de úlceras cutâneas de ratos utilizando um modelo animal de insuficiência arterial e diabetes *mellitus*. Inicialmente, os animais (n=14) foram divididos em grupo controle e cirurgia de OAF e foram avaliados por ultrassonografia com ecodoppler antes da cirurgia e após a cirurgia aos 5, 10 e 15 dias. Na etapa seguinte, os animais (n=106) foram divididos em 8 grupos: Controle (C, n=13), Doença Arterial Periférica (DAP, n=14), Doença Arterial Periférica com laser 12 joules (DAP L12, n=14), Diabetes *Mellitus* (DM, n=13), Diabetes *Mellitus* com laser 12 joules (DM L12, n=12), Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* (DAP DM, n=14), Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com laser 12 joules (DAP DM L12, n=14) e Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com laser 6 joules (DAP DM L6, n=12). Os grupos C, DM, DM L12 não realizaram a cirurgia de OAF e todos os grupos foram submetidos à ferida cutânea. Os desfechos analisados foram área da ferida, atividade de metaloproteinase 2 (MMP-2) e quantificação do colágeno. Como resultados, o ecodoppler demonstrou que foi mantida a obstrução da artéria femoral durante o período avaliado; a associação de DAP e DM mostrou que ocorre um retardo na cicatrização dos ferimentos e quando foi utilizado o LBI como tratamento, a dose de 6 joules acelerou a cicatrização dos ferimentos na primeira semana de intervenção, enquanto a dose de 12 joules atrasou a cicatrização dos ferimentos; houve maior atividade da pro-MMP2 no grupo DAP DM L6 e não houve diferença entre os grupos quanto à distribuição de colágenos. Sendo assim, foi possível concluir que o modelo proposto foi eficaz na oclusão total da artéria femoral durante o tempo avaliado; o LBI atuou como um agente acelerador da cicatrização no início do tratamento apenas na dose de 6 joules, porém ele não influenciou a distribuição do colágeno na derme.

Palavras-chave: Doença Arterial Periférica, Diabetes *Mellitus*, Cicatrização, Metaloproteinase, Laser de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

Peripheral Artery Disease (PAD) is characterized by a chronic and obstructive process caused by the presence of atherosclerosis where there is a reduction of blood flow to the lower limbs. It is associated with other disorders such as diabetes mellitus. Cutaneous ulcers of arterial origin are a result of the lack of arterial blood supply. One of the therapeutic resources that have been suggested as a part of wound treatment is the low-level laser therapy (LLLT). Therefore, the study had the following objectives: 1) To evaluate the efficiency of the arterial insufficiency model by analyzing the femoral artery blood flow after total femoral artery occlusion (OAF) surgery in rats; 2) To evaluate the effects of the application of LLLT on the healing of cutaneous ulcers of rats in an animal model of arterial insufficiency and diabetes mellitus. Initially, the animals (n = 14) were divided into a control group and a group that underwent OAF surgery and were evaluated by Doppler ultrasonography before surgery and after surgery at 5, 10 and 15 days. In the next step, the animals (n = 106) were divided into 8 groups: Control (C, n = 13), Peripheral Artery Disease (DAP, n = 14), Peripheral Artery Disease with 12 joules laser (DAP L12, n = 14), Diabetes Mellitus (DM, n = 13), Diabetes Mellitus with 12 joules laser (DM L12, n = 12), Peripheral Artery Disease and Diabetes Mellitus (DAP DM, n = 14), Peripheral Artery Disease and Diabetes Mellitus with 12 joules laser (DAP DM L12, n = 14) and Peripheral Artery Disease and Diabetes Mellitus with 6 joules laser (DAP DM L6, n = 12). Groups C, DM, DM L12 did not have OAF surgery and all groups were submitted to cutaneous ulcer. The outcomes analyzed were ulcer area, metalloproteinase 2 activity (MMP-2), and collagen quantification. As a result, the Doppler ultrasonography showed that the femoral artery obstruction was maintained during the period evaluated; the association of DAP and DM showed a delay in the wound healing and when LLLT was used as a treatment, the dose of 6 joules accelerated wound healing in the first week of intervention while the dose of 12 joules delayed the wound healing ; there was greater pro-MMP2 activity in the DAP DM L6 group and there was no difference between the groups regarding the collagen distribution. Thus, it was possible to conclude that the proposed model was effective in total occlusion of the femoral artery during the time evaluated; the LLLT acted as an accelerating healing agent at the start of treatment only at the dose of 6 joules dose but it did not influence the distribution of collagen in the dermis.

Keywords: Peripheral Artery Disease, Diabetes Mellitus, Healing, Metalloproteinase, Low-Level laser therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1:CIRURGIA DE OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL ESQUERDA.....	32
FIGURA2:ULTRASSONOGRRAFIA DE ECODOPPLER DE VASOS FEMORAIS.....	33
FIGURA 3:LOCAIS ONDE FORAM CAPTURADAS AS IMAGENS DE ECODOPPLER NOS MEMBROS PÉLVICOS.....	33
FIGURA 4:GLICOSÍMETRO ACCU-CHEK (PERFORMA); ROCHE DIAGNÓSTICA UTILIZADO PARA VERIFICAR A GLICEMIA DOS ANIMAIS.....	35
FIGURA 5:INDUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA.....	36
FIGURA 6:MENSURAÇÃO DAS FERIDAS CUTÂNEAS UTILIZANDO SUPORTE E CÂMERA (À ESQUERDA) E ESCALA (À DIREITA)	37
FIGURA 7:PROCESSAMENTO DAS IMAGENS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ, GRUPO CONTROLE.....	38
FIGURA 8:TRATAMENTO COM LBI UTILIZANDO O APARELHO PHOTON LASER III (DMC, BRASIL) (ESQUERDA). APLICAÇÃO DO LASER NA FERIDA (DIREITA).....	40
FIGURA 9:ANÁLISE DE LÂMINA DE PELE NO SOFTWARE IMAGEJ CORADA COM PICROSIRUS RED CAPTADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ POLARIZADA.....	43
FIGURA 10:IMAGENS DE ULTRASSONOGRRAFIA COM ECODOPPLER CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES SEGMENTOS ANALISADOS EM ANIMAL CONTROLE.....	45
FIGURA 11:IMAGENS DE ECODOPPLER MOSTRANDO O FLUXO ARTERIAL EM RATO ANTES DA OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.....	46
FIGURA 12:IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL QUE PASSOU POR OCLUSÃO DE ARTÉRIA FEMORAL (OAF) 5, 10 E 15 DIAS APÓS A CIRURGIA.	47
FIGURA 13:IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL NO 15º APÓS A CIRURGIA DE OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.....	48
FIGURA 14:EFEITO DA DOENÇA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS DM, DAP E DAP DM COMPARADOS COM O GRUPO CONTROLE.....	49

FIGURA 15: EFEITOS DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.....	51
FIGURA 16: EFEITOS DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DIABETES <i>MELLITUS</i>	52
FIGURA 17: EFEITOS DO LASER (L12 E L6) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA E DIABETES <i>MELITUS</i>	53
FIGURA 18: GÉIS DE ZIMOGRÁFIA MOSTRANDO A ATIVIDADE DA PRÓ-ENZIMA (PRO-MMP2) E METALOPROTEINASE-2 (MMP-2)	55
FIGURA 19: ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE-2, PRÓ-ENZIMA (PRO MMP2) NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE	56
FIGURA 20: ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE-2, MMP2, NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE.....	57
FIGURA 21: FOTOMICROGRAFIAS DA PELE CICATRIZADA DE RATOS WISTAR CORADAS COM <i>PICRO SIRIUS RED</i> COM AUMENTO DE 10X.....	58
FIGURA 22: FOTOMICROGRAFIAS DA PELE CICATRIZADA DE RATOS WISTAR CORADAS COM <i>PICRO SIRIUS RED</i> COM AUMENTO DE 10X.....	59
FIGURA 23: DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO SEPARADAS POR CORES DAS LÂMINAS CORADAS COM O <i>PICRO SIRIUS RED</i>	60
FIGURA 24: PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E III NA DERME.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PARÂMETROS DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE UTILIZADO NAS 2 SEMANAS DE TRATAMENTO.	39
TABELA 2: RESULTADOS DO EFEITO DA DOENÇA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS DM, DAP E DAP DM COMPARADOS COM O GRUPO CONTROLE.....	49
TABELA 3: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.....	50
TABELA 4: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DIABETES <i>MELLITUS</i>	51
TABELA 5: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER (L12 E L6) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DAP E DM.....	53

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO DO ESTÁGIO DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE ACORDO COM A SINTOMATOLOGIA DO PACIENTE SEGUNDO FONTAINE E RUTHERFORD.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAP	-Doença Arterial Obstrutiva Periférica
LBI	-Laser de Baixa Intensidade
DM	-Diabetes <i>Mellitus</i>
A1c	-Hemoglobina Glicada
PCR	-Proteína C Reativa
LDL	- <i>Low Density Lipoproteins</i>
AGE	- <i>Advanced Glycation End Products</i>
ITB	-Índice Tornozelo-Braquial
CI	-Claudicação Intermitente
MMP	-Metaloproteinase da matriz extracelular
OAF	-oclusão da artéria femoral
STZ	-Estreptozotocina
J	-Joule
APS	-Persulfato de amônio
SDS	-Dodecil Sulfato de Sódio (<i>SodiumDodecyl Sulfate</i>)
TEMED	-Tetrametiletilenodiamina (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
PSR	- <i>Picro Sirius Red</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	HIPOTESES.....	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1	Descrição do Estudo.....	30
5.2	Avaliação de Fluxo da Artéria Femoral.....	31
5.2.1	Cirurgia de Oclusão da Artéria Femoral (OAF).....	31
5.2.2	Avaliação do fluxo dos vasos do membro pélvico.....	32
5.3	Verificação da glicemia.....	35
5.4	Indução do Diabetes Experimental.....	35
5.5	Indução da ferida cutânea.....	36
5.6	Avaliação morfométrica da área da ferida cutânea.....	37
5.7	Intervenção com o Laser de Baixa Intensidade.....	38
5.8	Zimografia.....	41
5.9	Análise Histológica.....	42
5.10	Análise Estatística.....	43
6	RESULTADOS.....	45
6.1	Fluxo dos vasos de membro inferior.....	45
6.2	Cicatrização das feridas.....	48

6.3	Atividade da metaloproteinase 2 da Pele.....	54
6.4	Quantificações do Colágeno.....	57
7	DISCUSSÃO.....	62
8	CONCLUSÃO.....	68
9	REFERÊNCIAS	69
	Anexo A – Aprovação da Comissão de ética no uso de animais da UFPR.....	75
	Anexo B – Aprovação da Comissão de ética no uso de animais da UIC.....	76

1 INTRODUÇÃO

A Doença Arterial Periférica (DAP) é caracterizada por um processo obstrutivo que ocasiona a redução gradual do fluxo sanguíneo nos membros inferiores. Esse processo ocorre devido ao estreitamento da luz das artérias e está fortemente associada à doença aterosclerótica. A DAP está comumente associada a outros distúrbios, incluindo o *diabetes mellitus*. Uma das manifestações clínicas são as úlceras causadas pela redução do suprimento sanguíneo arterial, resultando em hipóxia e danos teciduais e sua cicatrização somente ocorre quando a perfusão dos tecidos é reestabelecida. Uma das terapias físicas que vem sendo sugeridas como parte integrante do tratamento das úlceras é o Laser de Baixa Intensidade (LBI), que pode ser utilizado para abreviar o tempo de cicatrização por sua atuação a nível celular. Além de auxiliar no processo de cicatrização, o LBI ainda pode aumentar a síntese de colágeno e estimular a microcirculação vascular.

O presente estudo buscou avaliar a eficiência do modelo de insuficiência arterial após a cirurgia de oclusão da artéria femoral em ratos e, os efeitos da aplicação do Laser de Baixa Intensidade na cicatrização de feridas cutâneas através do modelo animal de insuficiência arterial e *diabetes mellitus*. Ainda, com a proposta de tratamento utilizando o LBI foram avaliados os parâmetros morfométricos das feridas, a composição fibrótica da matriz extracelular da pele e a atividade enzimática de metaloproteinase 2, pois o LBI poderia influenciar diretamente na sua atividade bem como a sua expressão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Doença Arterial Periférica (DAP) é caracterizada como uma obstrução parcial ou total das artérias periféricas trazendo como consequência uma redução da perfusão dos tecidos que são irrigados por essas artérias levando assim, ao desenvolvimento de sintomas clínicos e até mesmo de uma necrose tecidual (SALES et al., 2012).

A prevalência da DAP está associada com o aumento da idade (CRIQUI; ABOYANS, 2015) tendo um acréscimo em 20% entre os indivíduos na faixa etária dos 60 e 50% na faixa etária dos 85 anos (SIGVANT et al., 2015). Nos Estados

Unidos, a DAP afeta 8 milhões de indivíduos sendo que 20% dos adultos apresentam mais de 55 anos de idade (MUIR, 2009).

A progressão da DAP está relacionada além do aumento da idade, ao tabagismo, diabetes *mellitus* (DM), hipertensão, dislipidemia, obesidade, histórico familiar de doença cardiovascular (JOHNSTON et al., 1988), sexo masculino (SIGVANT et al., 2015), sendo que nas mulheres, na fase pré-menopausa, o estrogênio aparece como efeito protetor na progressão da DAP (MASCARENHAS et al., 2014).

O tabagismo aparece como um dos mais importantes fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento de DAP. Indivíduos fumantes apresentam 3 vezes mais o sintoma da claudicação intermitente (CI) que os não fumantes (MASCARENHAS et al., 2014). As complicações do tabagismo são atribuídas à disfunção endotelial e aos estados pró-inflamatórios e trombóticos (AMBROSE; BARUA, 2004).

A Doença Arterial Periférica é uma das principais complicações associadas ao diabetes *mellitus* (DM) com prevalência estimada entre 13,7 e 20% (NORGREN et al., 2007). Pacientes com DM tem um risco 4 vezes maior de desenvolver a DAP quando comparado a uma paciente que não apresente o diagnóstico de DM e, para cada 1% de aumento da hemoglobina glicada (A1c), existe um risco aumentado em 26% em desenvolver a doença (SELVIN et al., 2004). Indivíduos diabéticos e com diagnóstico de DAP tem de 5 a 10 vezes mais chances de apresentarem aterosclerose, que é responsável por 85% das causas de DAP (BENDICK et al., 1983).

O DM é um problema de saúde global que afeta crianças, adolescentes e adultos. O Diabetes *Melittus* (DM) é caracterizado como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos e que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação, na secreção da insulina ou em ambas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o número de adultos diagnosticados com Diabetes em 2014 era 422 milhões comparado com 108 milhões em 1980. Em 2012 o número de mortes devido ao DM foi de 1.5 milhões de pessoas. A glicose aumentada nos indivíduos com DM causou um número adicional de 2.2 milhões de mortes aumentando assim o risco do

desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A DAP aparece também como o maior fator de risco para amputações de membros inferiores e também é acompanhada de alta probabilidade de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares associadas (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005). Indivíduos com claudicação intermitente e diabetes apresentam risco aumentado de isquemia aguda e de amputação mais abrangente comparado à população de pacientes com claudicação intermitente não-diabéticos (MCDANIEL; CRONENWETT, 1989). Em 20-30% dos casos com isquemia crítica, o tratamento restaurador como as revascularizações não é possível de ser feito, deixando como último recurso de tratamento a amputação (YOSHIDA, 2005).

Como na maioria dos casos os pacientes com DAP são assintomáticos é extremamente importante o diagnóstico precoce da DAP, incluindo a população diabética onde boa parte também são assintomáticos. Isso torna possível uma rápida intervenção diminuindo os riscos de uma amputação ou até mesmo a possibilidade de diagnosticar outras doenças cardiovasculares associadas, como por exemplo, isquemia do miocárdio. O diagnóstico precoce da DAP pode reduzir a ocorrência de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e consequentemente a mortalidade por doenças cardiovasculares (MAKDISSE et al., 2008).

A causa mais comum da DAP é a aterosclerose que resulta na redução do diâmetro do lúmen das artérias dos membros inferiores no qual envolve disfunção endotelial, distúrbio lipídico, ativação plaquetária, trombose e estresse oxidativo (MUIR, 2009). Quando a placa aterosclerótica se forma em vasos dos membros inferiores, pode levar a uma obstrução nesse vaso, interrompendo o fluxo sanguíneo e desenvolvendo, por consequência, a isquemia tecidual progressiva (FLETCHER et al., 2006) Porém a causa da oclusão pode ser devido a algumas doenças, como: lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, síndrome de aprisionamento e aneurisma de artéria poplítea, estágio crônico de embolia (AZUMA, 2018).

A aterosclerose no diabético apresenta-se de forma mais difusa e mais grave manifestando-se em idade mais precoce do que a presente em pacientes não-diabéticos (DELUCCIA, 2003). As mudanças pro-aterogênicas no diabético incluem

aumentos na inflamação vascular e desorganização nos componentes celulares da parede vascular. A inflamação tem sido estabelecida como um fator de risco para a doença aterotrombótica (BOULTON et al., 2008). Níveis aumentados de proteína C reativa (PCR) foram associados ao desenvolvimento de DAP. Essa proteína tem sido considerada um marcador inflamatório por ter um papel importante no processo de adesão e migração de leucócitos através da parede endotelial (RIDKER, 1998).

As células endoteliais exercem um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose. Elas modulam a relação entre os elementos celulares do sangue e parede vascular, mediando o balanço normal entre trombose e fibrinólise, desempenhando um papel na interação entre leucócitos e células da parede vascular. As anormalidades nas células endoteliais predispõem o sistema arterial à aterosclerose e está associada a desfechos fisiopatológicos distintos. O início do processo aterosclerótico está relacionado a uma lesão da superfície do endotélio, causada por fatores de risco como hipertensão, hiperlipidemia ou até mesmo uma inflamação, e o estresse oxidativo. Esse início é então resultado de uma disfunção do endotélio. Com a lesão, ocorre um aumento da permeabilidade do endotélio e estimulação de citocinas resultando no recrutamento de linfócitos e monócitos. Ainda, a lesão endotelial é o fator desencadeante que permite que plaquetas, colesterol e outros componentes do sangue sejam expostos à parede do vaso (Levy, 2002).

O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento e na progressão da Doença Arterial Periférica. Níveis aumentados de radicais ânion superóxido são vistos em indivíduos com diabetes, hipercolesterolemia e hipertensão. A oxidação de partículas de LDL permite que elas permaneçam solúveis no plasma sanguíneo e assim permitam a passagem pelo endotélio contribuindo para o desenvolvimento da placa no vaso. A oxidação inicia a progressão da aterosclerose e leva ao aumento da inflamação, da ativação plaquetária e vasoconstrição. Para esses processos acontecerem várias células específicas são liberadas, como células musculares lisas, monócitos e macrófagos. As células endoteliais geram fatores de crescimento e citocinas, ocorre o aumento da migração dos macrófagos para o revestimento interno do vaso e assim, o tecido muscular liso se prolifera atenuando a formação das placas de ateromas. A lesão torna-se avançada e várias células estão envolvidas no processo, como, células musculares endoteliais e lisas, inflamatórias e

um núcleo lipídico, e todas elas são envoltas por uma capa fibrosa. A ruptura da parede dessa placa faz com que substâncias pró-coagulantes sejam expostas ao sangue circulante e estimulem a formação de trombos. Com o tempo as placas se acumulam e acabam por estreitar o diâmetro da luz do vaso e podem levar a um evento coronariano ou cerebrovascular (WATSON et al., 2006).

Existem vários mediadores da disfunção endotelial em indivíduos diabéticos e com DAP, entre eles pode-se destacar o óxido nítrico (NO). O NO é um potente vasodilatador e limita a inflamação via sua modulação através da interação parede vascular-leucócitos; além disso, o NO inibe a proliferação e a migração de células musculares lisas vasculares e limita a ativação plaquetária. Assim, a perda da homeostase normal de NO pode resultar em uma cascata de eventos na vasculatura, possibilitando o desenvolvimento da aterosclerose e suas conseqüentes complicações (BOULTON et al, 2008). A hiperglicemia é um fator que contribui com a homeostase deficiente do NO levando a alterações na microcirculação. Ela é responsável por induzir a glicosilação não-enzimática de diversos substratos (produzindo o que se denomina produtos finais da glicosilação avançada – advanced glycation end-products, AGE) e outras vias enzimáticas resultando, por exemplo, no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo que provocam o aparecimento de alterações morfológicas e funcionais da microcirculação (CADE, 2008).

Uma maneira simples de avaliar objetivamente a presença de DAP é o uso do índice tornozelo-braço (ITB), que se trata de um método não invasivo, de simples execução e que permite o diagnóstico da doença em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Ele é obtido pela razão entre a maior pressão sistólica obtida no tornozelo (artéria dorsal do pé e artéria tibial posterior) pela maior pressão sistólica obtida no braço (artéria braquial). O teste foi validado e apresentou 95% de sensibilidade e quase 100% de especificidade quando comparado ao diagnóstico confirmativo feito por angiografia (HIRST et al., 2006). Define-se como padrão de normalidade para o ITB valores entre 0,9 e 1,4, portanto, valores inferiores a 0,9 representam comprometimento do fluxo sanguíneo arterial nos membros inferiores e superiores a 1,4 representam alterações na compressibilidade das artérias (ROOKE et al., 2011).

A claudicação intermitente (CI) é o principal sintoma clínico da DAP observado na prática, onde o indivíduo apresenta dores ou desconforto nos membros inferiores durante uma caminhada ou exercícios e que são interrompidas com o repouso. A progressão desta condição pode levar à presença de necrose asséptica, com consequente perda de tecido e eventual amputação do segmento, em especial os pés.

Além da CI os indivíduos com DAP podem apresentar nos membros inferiores: pele seca, palidez, diminuição dos pulsos e da temperatura segmentar e a cianose. E esses sintomas dependem do grau de comprometimento do fluxo sanguíneo arterial dos membros inferiores. Sendo assim, o paciente é classificado de acordo com a magnitude da extensão da lesão. Existem 2 classificações que são as mais utilizadas, a de Fontaine e Rutherford (Quadro 1), que permitem avaliar o estágio em que a doença se encontra de acordo com os seus sinais e sintomas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR, 2015).

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO DO ESTÁGIO DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE ACORDO COM A SINTOMATOLOGIA DO PACIENTE SEGUNDO FONTAINE E RUTHERFORD.

CLASSIFICAÇÃO DE FONTAINE	CLASSIFICAÇÃO DE RUTHERFORD
Estágio I Assintomático	Categoria 0 Assintomático
Estágio II a) Claudicação intermitente limitante	Categoria 1 Claudicação leve
	Categoria 2 Claudicação moderada
Estágio II b) Claudicação intermitente incapacitante	Categoria 3 Claudicação severa
Estágio III Dor isquêmica em repouso	Categoria 4 Dor em repouso
Estágio IV Lesões tróficas	Categoria 5 Lesão trófica pequena
	Categoria 6 Necrose extensa

FONTE: Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculard, www.sbacv.org.br, 17/06/2019.

No que se refere ao tratamento dos pacientes que apresentam DAP, primeiramente é essencial a identificação dos fatores de risco, onde vários deles são modificáveis, como o tabagismo. Nessa fase é importante orientá-los quanto à importância no controle dos índices da pressão arterial, diminuição do colesterol e da hemoglobina glicada bem como cessar o uso do fumo, no caso de tabagista. Quando o indivíduo já apresenta algum sintoma, como a claudicação intermitente, é essencial avaliar a severidade desta para que não ocorra piora do quadro e iniciar o

tratamento, seja ele através de medicamentos e/ou exercícios físicos. No caso de haver uma piora dos sintomas e progressão para uma isquemia no membro o ideal é realizar exames complementares para localizar a lesão, como a angiografia, e através de indicação médica realizar uma intervenção cirúrgica, onde a mais utilizada são as revascularizações por meio da angioplastia (HIATT, 2001).

Tendo em vista que a DAP acomete diretamente o fluxo sanguíneo, uma das manifestações clínicas que os pacientes apresentam são as úlceras que são causadas exatamente pela redução do suprimento sanguíneo arterial, resultando em hipóxia e danos teciduais, prejudicando assim a cicatrização da ferida. As úlceras de origem arterial geralmente aparecem em regiões distais, como nos dedos dos pés, calcanhares, em proeminências ósseas como no tornozelo. Suas bordas são bem definidas com uma coloração mais pálida (GREY et al., 2006).

O principal objetivo do tratamento nos indivíduos com DAP é melhorar o aporte sanguíneo para que a perfusão dos tecidos seja reestabelecida de uma maneira mais rápida e eficaz, atingindo assim a cicatrização tecidual. O tratamento nem sempre é atingido rapidamente, especialmente quando o indivíduo apresenta as úlceras. Em algumas vezes, ela pode ter origem venosa e arterial concomitantemente, resultando no aparecimento de úlcera de origem mista o que pode dificultar ainda mais o tratamento. Dependendo das complicações no indivíduo, pode prejudicar ainda mais o tratamento, como a presença do diabetes tornando a cicatrização um processo mais lento. Ainda, alguns fatores podem atrasar ou até mesmo impedir a cicatrização da ferida, como por exemplo, infecção e necrose.

Um dos requisitos para garantir a cicatrização é manter as feridas úmidas, livres de infecção e de tecido necrótico. Existem alguns tipos de adesivos que ajudam no processo da cicatrização, mantendo o ambiente úmido, controlando a invasão e/ou proliferação bacteriana, desbridando o tecido necrótico. Esses adesivos atuam nos diferentes estágios da cicatrização, de acordo com a origem da úlcera, ajudando assim no reestabelecimento do reparo tecidual (HEDAYATI et al., 2015).

Em relação ao processo de cicatrização, para que haja o reparo do tecido lesado é necessário que ocorram alguns eventos celulares e moleculares. Esses eventos são divididos em etapas, ou fases da cicatrização: fase inflamatória, seguida

da de proliferação e finalizando com a de remodelamento. A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, com a liberação de substâncias vasoconstritoras. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata de coagulação. Os neutrófilos presentes logo nas primeiras 24 horas de lesão, auxiliam na destruição bacteriana e são aos poucos substituídos pelos macrófagos. Esses têm papel importante na síntese de matriz extracelular e na fase de transição para a fase proliferativa. Nessa segunda fase, ocorre a epitelização e formação de tecido de granulação, onde as principais células envolvidas são os fibroblastos e as células endoteliais. Na última fase que é a de remodelamento, ocorre a deposição do colágeno e por essa razão é considerado a fase mais importante clinicamente (BROUGHTON et al., 2006).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo em fase de cicatrização e o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. As fibras de colágeno dos tipos I e III se apresentam entrelaçadas na derme reticular. No tecido normalmente são constituídas por 90% do tipo I e 10% do tipo III. A resistência mecânica do tecido cicatricial está relacionada à presença de fibras de colágeno dos tipos I e III, que são o principal componente a conferir força de tensão ao tecido o que as torna, portanto, responsáveis pela manutenção da integridade da pele. Porém, quando há uma lesão, ocorrem também modificações na densidade destas fibras. As fibras do tipo III são predominantes na fase inicial do processo de cicatrização, sendo a longo prazo substituídas pelas fibras do tipo I, o que se manifesta através de um aumento da força de tensão e uma diminuição do tamanho da cicatriz (ROBSON et al., 2001).

A degradação do colágeno inicia-se precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório. Essa degradação ocorre a nível extracelular sendo mediada por colagenases específicas, entre elas podemos citar as metaloproteinasas (MMPs). Atualmente existem 28 tipos de MMPs identificadas (BENJAMIN; KHALIL, 2012) que são sintetizadas por diversas células, em especial fibroblastos e apresentam subgrupos nomeados de acordo com o substrato de maior afinidade ou localização na célula. A MMP-2 e a MMP-9 são classificadas como gelatinases devido à sua alta afinidade em degradar gelatina e, por isso, também são chamadas de gelatinase A e B, respectivamente (MURPHY; NAGASE, 2008) As MMPs têm se destacado por estarem envolvidas no desenvolvimento e cronicidade da úlcera. Isso se deve pelo fato de que durante o processo de formação de placas de ateromas

elas estão envolvidas na degradação da matriz extracelular (LIM et al., 2010). Além disso, elas participam de processos de migração celular, carcinogênese, cicatrização e renovação tissular por possuírem alta afinidade com componentes estruturais da matriz extracelular (TOTH; FRIDMAN, 2001). Quando sua cinética de ação está descontrolada, seja por alta síntese ou falta de mecanismos regulatórios, seus efeitos podem ser deletérios, contribuindo para a destruição e perda das propriedades mecânicas normais do tecido conjuntivo (MEYER et al., 2008; MURPHY; NAGASE, 2008).

A importância no estudo das MMPs deve-se pelo fato de estarem envolvidas nas etapas do processo de cicatrização. Além de contribuírem para o deslocamento de queratinócitos da membrana, elas atuam na formação da cicatriz (SHARPE; MARTIN, 2013). Alguns estudos mostram a ligação direta das MMPs na formação da placa de aterosclerose, devido à migração das células musculares lisas e o acúmulo na parede dos vasos (LIM et al., 2010). Sendo assim, as metaloproteinases têm sido muito investigadas pelo seu desempenho no processo de cicatrização de ferimentos crônicos, sabendo que seu balanço e regulação podem influenciar a progressão da cicatrização.

Para auxiliar no processo de cicatrização, terapias físicas vêm sendo sugeridas como parte integrante do tratamento de úlceras como uma maneira de abreviar o tempo de cicatrização, entre elas destacando-se o Laser de Baixa Intensidade (LBI) (KAJAGAR, 2012). Ele vem sendo utilizado desde a década de 60 e tem sido amplamente utilizado, por exemplo, na área da Odontologia (DE OLIVEIRA et al., 2015). Estudos mostram também a utilização do laser no tratamento de queimaduras de terceiro grau (VAGHARDOOST et al., 2018).

Ele é considerado um agente biomodulador por estimular funções biológicas através da absorção da luz por moléculas fotossensíveis na célula e não causar nenhum dano tecidual por possuir características não-térmicas e não citotóxicas (EISSA; SALIH, 2017). Ao contrário, existe o laser de alta intensidade que possui características abrasivas e a sua utilização provoca aumento da temperatura local. Esse tipo de laser é utilizado, por exemplo, em cirurgias para remoção de tumores (STAFFORD et al., 2010), ou até mesmo para tratamento de nódulos como alternativa a procedimentos cirúrgicos (MAURI et al., 2019).

Com a utilização do Laser de Baixa Intensidade, a energia absorvida não é transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos, foto físicos e/ou fotobiológicos. Quando a luz do laser interage com as células e tecidos na dose adequada, certas funções celulares podem ser estimuladas, como a ativação de linfócitos e mastócitos, o aumento na produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos de células, promovendo, assim, efeitos anti-inflamatórios (JUNIOR et al., 2007).

Tem sido demonstrado que o LBI atua diretamente no processo de cicatrização por aumentar a formação do tecido de granulação (SILVEIRA, 2007). A absorção molecular da luz permite um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno (O'BRIEN, 1998).

No entanto, a literatura carece de estudos que avaliem a eficiência do Laser em úlceras, tomando como marcadores de cicatrização a área dos ferimentos associada a variáveis biológicas como o estudo da expressão de proteínas diretamente envolvidas no processo de lesão e reparo tecidual. Ainda, é importante salientar que na maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos que apontam um efeito benéfico cicatrizante do Laser, a lesão cutânea não estava associada à disfunção circulatória. Além disso, há um consenso na literatura sobre a necessidade da realização de mais estudos pré-clínicos com os parâmetros físicos de laser bem definidos com o intuito de que a dose terapêutica seja mais bem definida para cada tipo de etiologia a ser tratada.

No que se refere aos modelos animais, existem vários estudos com diferentes tipos de animais, como coelhos, porcos, ratos e camundongos, com diferentes localizações das feridas para avaliar úlceras de pressão, venosa e diabéticas (ANSELL et al., 2012; NUNAN; HARDING; MARTIN, 2014). Porém, não há estudos associando o ferimento cutâneo em modelo animal com o distúrbio circulatório, no caso, a Doença Arterial Periférica.

Portanto, neste estudo foi possível a validação do modelo de insuficiência arterial em animais que possibilitou estudar as possíveis alterações vasculares

provenientes da insuficiência arterial bem como a associação de um modelo de ferimento cutâneo para a análise da cicatrização dos ferimentos.

Além do que, o estudo com esse modelo permitirá um controle padronizado da área inicial das feridas, além da padronização das doses terapêuticas utilizadas com o Laser de Baixa Intensidade.

Ainda, o estudo contribuirá para o melhor entendimento da influência e comportamento das MMPs em úlceras cutâneas em um modelo de insuficiência arterial e na insuficiência arterial associada ao DM (comumente presente na população humana), bem como os efeitos da aplicação do laser de baixa intensidade na cicatrização desses ferimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da aplicação do Laser de Baixa Intensidade na cicatrização de feridas cutâneas de ratos através de um modelo animal de Insuficiência Arterial e Diabetes *Mellitus* (DM).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficiência do modelo de insuficiência arterial através da análise do fluxo sanguíneo da artéria femoral após a cirurgia de oclusão do vaso em ratos.

Avaliar os parâmetros morfométricos das úlceras em ratos com insuficiência arterial e DM diante da aplicação de laser de baixa intensidade de comprimento de onda de 660nm.

Avaliar as atividades enzimáticas de metaloproteinases 2 das úlceras ou dos tecidos marginais em ratos com Insuficiência Arterial e DM tratados com laser de baixa intensidade.

Avaliar a disposição de fibras colágenas em tecido de pele após cicatrização das úlceras cutâneas tratadas com laser de baixa intensidade.

4 HIPOTESSES

- A Doença Arterial Periférica e o Diabetes Mellitus retardam o processo de cicatrização das feridas cutâneas em modelo animal;
- O Laser de Baixa Intensidade acelera o processo de cicatrização em modelos animais de insuficiência arterial e DM;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo pré-clínico com 106 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-350 gramas. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR no qual foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas/12 horas e com livre acesso à água e ração.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=106):

- 1) Grupo Controle (GC);
- 2) Grupo Doença Arterial Periférica (DAP);
- 3) Grupo Doença Arterial Periférica com Laser de Baixa Intensidade 12J (DAP L12);
- 4) Grupo Diabetes Mellitus (DM);
- 5) Grupo Diabetes Mellitus com Laser de Baixa Intensidade 12J (DM L12);
- 6) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes Mellitus (DAP DM);
- 7) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes Mellitus com Laser de Baixa Intensidade 12J (DAP DM L12);
- 8) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes Mellitus com Laser de Baixa Intensidade 6J (DAP DM L6);

Os procedimentos foram realizados em dois locais distintos. A avaliação do fluxo arterial após a cirurgia de oclusão da artéria femoral (OAF) foi realizada no Departamento de Fisiologia e Biofísica, Laboratório de Cardiologia, da Universidade de Illinois em Chicago (UIC), Estados Unidos. Os demais procedimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, Brasil. Em ambos locais, os procedimentos seguiram as recomendações para utilização de animais em pesquisa e foram previamente aprovados pelos Comitês de Ética em pesquisa animal das Instituições (Anexo A e Anexo B).

O estudo foi dividido em etapas e serão descritas detalhadamente a seguir:

5.2 AVALIAÇÃO DE FLUXO DA ARTÉRIA FEMORAL

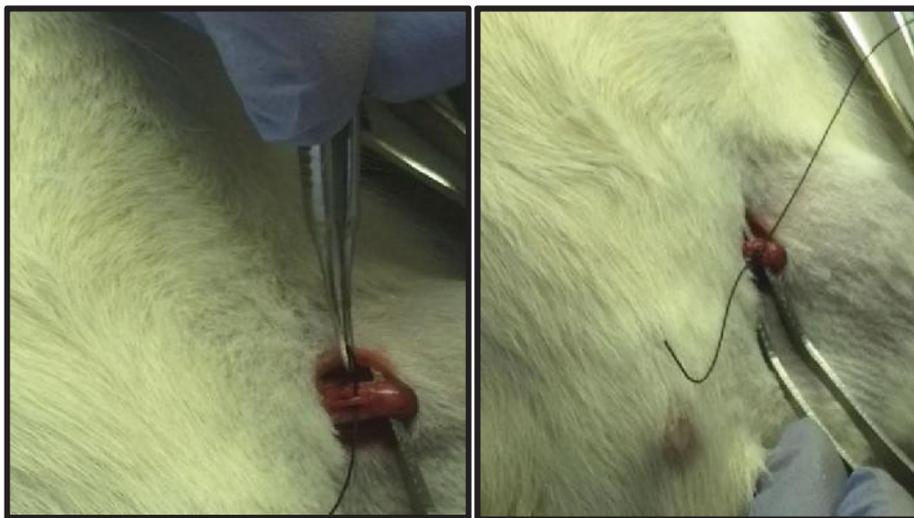
Previamente à avaliação do fluxo arterial foi realizada a cirurgia de oclusão da artéria femoral (OAF). Para a avaliação do fluxo arterial dos membros pélvicos, foram utilizados 13 animais e divididos em dois grupos: grupo OAF e grupo controle. O objetivo dessa avaliação foi verificar ausência de fluxo femoral abaixo do local da obstrução em três momentos distintos (5, 10 e 15 dias após a cirurgia de OAF) por meio de ultrassonografia com ecodoppler.

5.2.1 Cirurgia de Oclusão da Artéria femoral (OAF)

O modelo utilizado foi o de obstrução total do fluxo da artéria femoral. Os animais passaram por procedimentos de anestesia e assepsia previamente ao procedimento cirúrgico.

Com o objetivo de mimetizar a condição de insuficiência arterial de membros pélvicos, foi realizada cirurgia de oclusão da artéria femoral (OVF) esquerda dos animais de ambos os grupos. Sob anestesia, foi feita uma incisão na região inguinal, a artéria femoral foi separada da veia femoral e o fluxo arterial foi totalmente obstruído logo acima da anastomose da veia epigástrica superficial, através de ligadura com fio de sutura de seda (4.0) ao redor da artéria (Figura 1). No dia da cirurgia até 48h após, foi administrado uma dose de 0,1 mg/kg de buprenorfina via intraperitoneal a cada 12h, de acordo com as recomendações do comitê de ética animal da UIC para a recuperação do procedimento cirúrgico.

FIGURA 1: CIRURGIA DE OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL ESQUERDA.



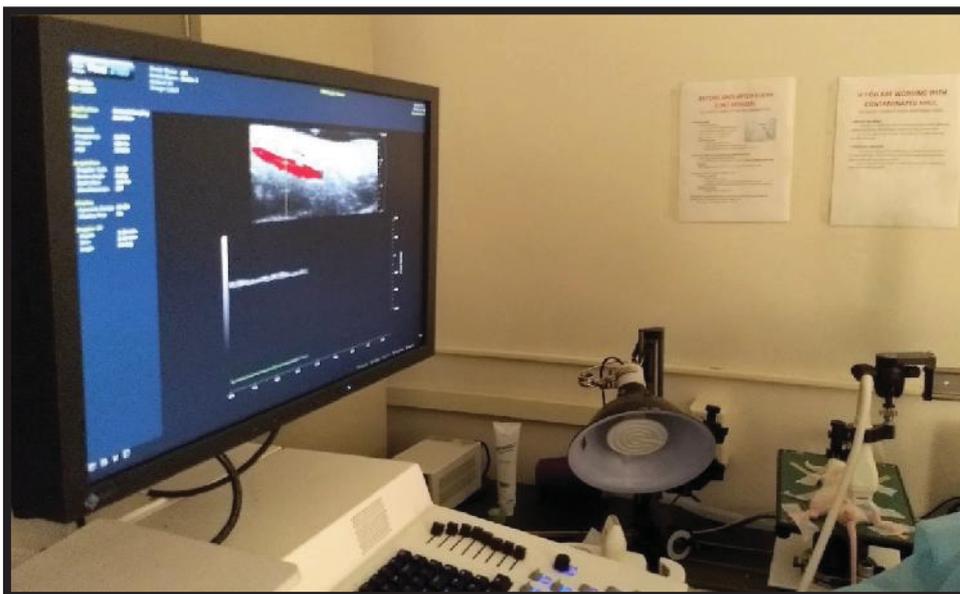
LEGENDA: À esquerda dissecação da artéria femoral, à direita, oclusão total do fluxo arterial.

FONTE: a autora

5.2.2 Avaliação do fluxo dos vasos de membro pélvico

Foi realizado análise de ultrassom com ecodoppler, por um profissional devidamente treinado com o objetivo de verificar o fluxo arterial nos membros inferiores em 4 momentos distintos: antes da OAF; 5, 10 e 15 dias após a OAF. Os animais foram anestesiados com isoflurano e ambos os membros inferiores foram avaliados por aproximadamente 20 minutos com o equipamento *Vevo® 2100 Imaging System (Fujifilm VisualSonics)*, utilizando o transdutor MS550D (frequência 22-55MHz), específico para estudos em pequenos animais (Figura 2).

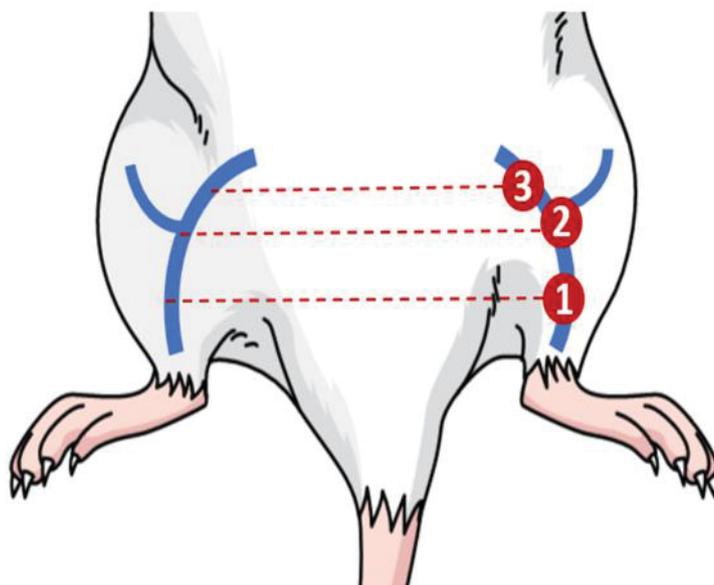
FIGURA 2: ULTRASSONOGRAFIA DE ECODOPPLER DE VASOS FEMORAIS.



FONTE: Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Illinois em Chicago (UIC)

A análise foi realizada em três segmentos nos dois membros pélvicos: fluxo distal e proximal da artéria safena e artéria epigástrica superficial e fluxo da artéria femoral (Figura 3).

FIGURA 3 - LOCAIS ONDE FORAM CAPTURADAS AS IMAGENS DE ECODOPPLER NOS MEMBROS PÉLVICOS.



LEGENDA: 1: fluxo distal da artéria safena; 2: fluxo proximal da artéria safena e da artéria epigástrica superficial; 3: fluxo da artéria femoral.

Fonte: a autora.

As demais etapas do estudo foram realizadas de acordo com o seguinte cronograma:

-Dia 01: Jejum de 14 horas para todos os grupos experimentais previamente à Indução do Diabetes Mellitus (DM);

-Dia 02: Verificação da glicemia e peso de todos os grupos experimentais + Cirurgia de Indução do DM para os grupos DM e DAP DM. Nos demais grupos (Controle e DAP) foi realizado o mesmo procedimento, porém sem o composto diabetogênico;

-Dia 09: Verificação da glicemia de todos os grupos experimentais com jejum de 8 horas;

-Dia 10: Cirurgia de Indução de Doença Arterial para os grupos DAP e DAP DM. Nos demais grupos (Controle e DM) foi realizado o mesmo procedimento, porém sem a obstrução da artéria femoral + Indução de Úlcera Cutânea para todos os grupos experimentais + Início da avaliação morfométrica das feridas através da captação de imagens;

-Dia 11 ao dia 15: Primeira semana de tratamento com o Laser de baixa Intensidade 6J (Grupo DAP DM L6) e 12J (Grupos DAP L12, DM L12 e DAP DM L12) + Avaliação morfométrica das feridas. Nos grupos Controle, DAP e DM foi realizado somente a avaliação morfométrica das feridas;

-Dia 17 ao dia 22: Segunda semana de tratamento com o Laser de baixa Intensidade 6J (Grupo DAP DM L6) e 12J (Grupos DAP L12, DM L12 e DAP DM L12) + Avaliação morfométrica das feridas. Nos grupos Controle, DAP e DM foi realizado somente a avaliação morfométrica das feridas;

-Dia 23: Verificação do peso e glicemia de todos os grupos experimentais previamente ao procedimento de eutanásia. Avaliação morfométrica das feridas + Procedimento de eutanásia seguido da coleta de material para a análise histológica e zimografia;

5.3 VERIFICAÇÃO DA GLICEMIA

No dia 02, previamente à cirurgia de indução do DM e após jejum de 14 horas, os animais foram pesados e a glicemia basal foi verificada por meio de amostra sanguínea retirada da veia caudal utilizando um glicosímetro portátil (*Accu-chek Advantage*, Roche Diagnostica, São Paulo, Brasil) (Figura 4). No dia 09, após jejum de 8 horas, foi verificada novamente a glicemia. Os animais que apresentaram níveis glicêmicos maiores que 200mg/dL confirmaram o desenvolvimento do diabetes experimental. A glicemia foi confirmada por colorimetria com o kit da Labtest Glicose Liquiform a partir de uma amostra de sangue retirada no dia da eutanásia. Foram considerados os valores da glicemia capilar, pois a xilazina e cetamina usadas para anestesia podem alterar a glicemia.

FIGURA 4: GLICOSÍMETRO ACCU-CHEK (PERFORMA); ROCHE DIAGNOSTICA UTILIZADO PARA VERIFICAR A GLICEMIA DOS ANIMAIS.



FONTE: a autora

5.4 INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS*

O diabetes experimental foi induzido sob jejum prévio de 14 horas no dia 02 do experimento após a verificação da glicemia basal. Sob anestesia (cetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, i.p.), os animais dos grupos DM, DM L12, DAP DM, DAP DM L12 e DAP DM L6 receberam dose única de estreptozotocina (STZ) (45mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato (10mM, pH 4.5) por meio de injeção intravenosa (veia peniana). Esse composto possui mecanismo citotóxico nas células β -pancreáticas (CARDINAL et al., 1998), provocando DM quando administrada em animais em jejum. Com uma única administração intravenosa de 45-60 mg/kg de

STZ é possível observar nas células β -pancreáticas a presença de núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos em apenas 3 horas (BLACK et al, 2010). Essas manifestações indicam apoptose celular e tornam-se ainda mais severas após 12 horas de administração (NAGASAO et al, 2005).

Os animais do grupo Controle e DAP receberam a mesma dosagem do veículo (tampão citrato), sem o composto diabetogênico. Esse procedimento garante que o estresse sofrido pelos animais que foram manipulados para a indução do diabetes seja igual ao dos animais normoglicêmicos. No dia 09 e após jejum de 8 horas, todos os animais foram pesados e a glicemia foi verificada por meio de amostra sanguínea retirada da veia caudal utilizando o glicosímetro portátil.

5.5 INDUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA

O modelo utilizado para mimetizar a ferida cutânea foi descrito por Gulcan e colaboradores (GULCAN et al., 2012). Todos os animais passaram por esse procedimento após a cirurgia de oclusão da artéria femoral, incluindo o grupo controle e DM. Inicialmente foi tricotomizada a região posterior do membro pélvico esquerdo (coxa) do animal. Esse procedimento de indução do ferimento foi realizado no mesmo membro onde foi realizado a cirurgia para obstrução da artéria. Em seguida foi utilizado um objeto em formato circular com diâmetro aproximado de 2cm para delimitar a área do ferimento. E então, com uma tesoura, a pele foi retirada seguindo o contorno circular da região marcada (Figura 5).

FIGURA 5: INDUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA.

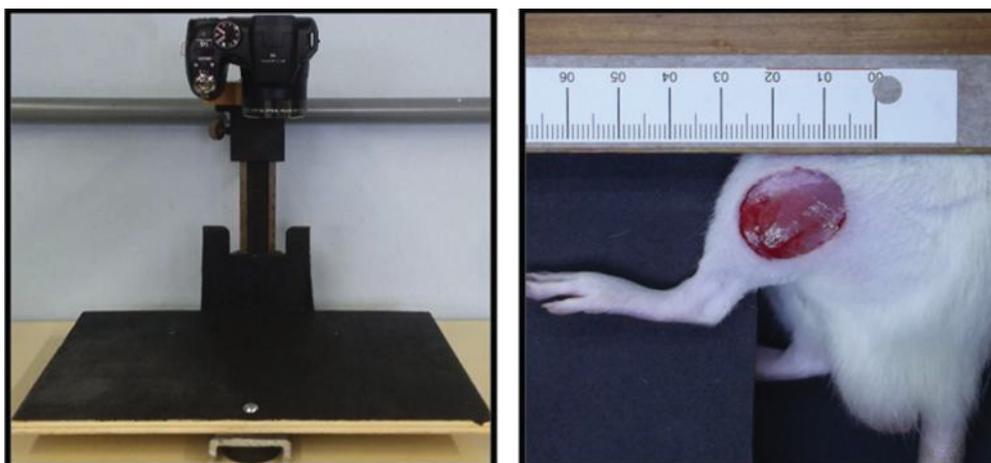


LEGENDA: Esquerda: Delimitação da área do ferimento. Direita: Retirada da pele seguindo o contorno circular. FONTE: a autora.

5.6 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA ÁREA DA FERIDA CUTÂNEA

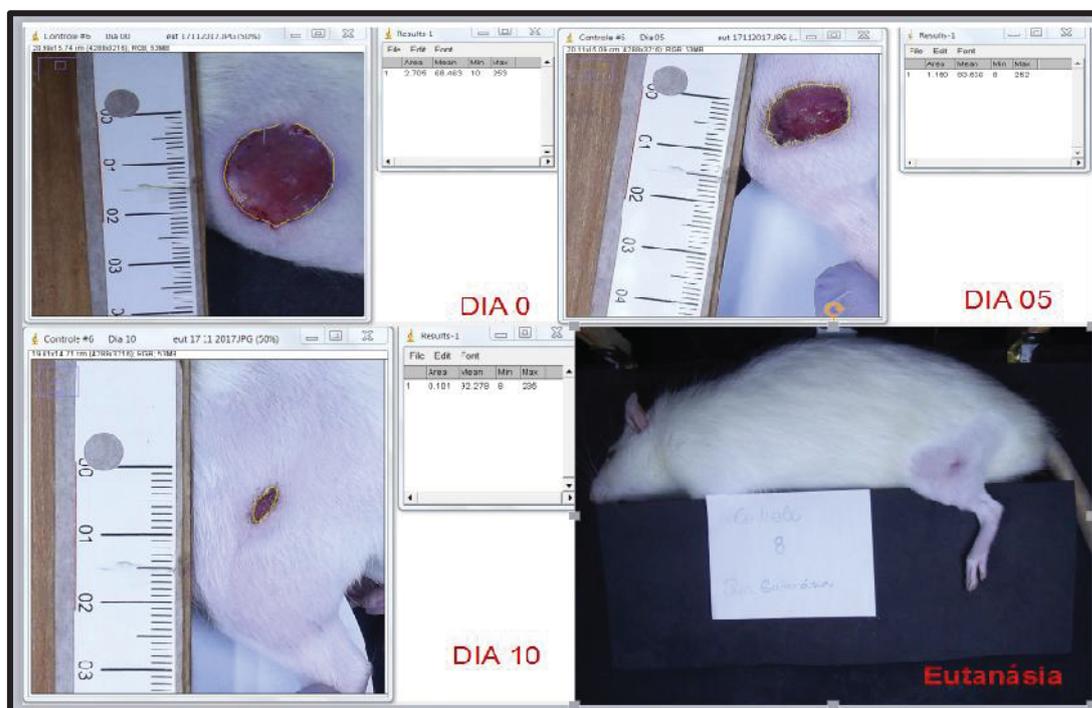
Após a indução do ferimento cutâneo foi realizada a mensuração da área da ferida em todos os grupos experimentais. As feridas foram fotografadas utilizando uma câmera Fujifilm, modelo FinePix S2980 a uma distância de 15cm, ângulo de 90° com fundo escuro e com escala métrica ao lado (Figura 6). O registro foi realizado logo após a indução do ferimento, na primeira semana de tratamento após a intervenção com o Laser, na segunda semana, em dias alternados, também após a intervenção com o Laser e no dia da Eutanásia totalizando 10 registros de cada animal por grupo (Figura 7).

FIGURA 6: MENSURAÇÃO DAS FERIDAS CUTÂNEAS UTILIZANDO SUPORTE E CÂMERA (À ESQUERDA) E ESCALA (À DIREITA)



FONTE: a autora.

FIGURA 7: PROCESSAMENTO DAS IMAGENS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ, GRUPO CONTROLE



FONTE: a autora.

As fotos foram processadas para o cálculo da área por meio do software *ImageJ* 1.45 (NIH). Para o processamento, a foto foi calibrada de acordo com a escala métrica e foi feita seleção manual da área do ferimento obtendo a extensão em cm² e em valores de porcentagem de cicatrização.

5.7 INTERVENÇÃO COM O LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

O tratamento com o Laser de baixa Intensidade (LBI) foi realizado no dia seguinte à indução do ferimento sem anestesia. Os grupos DAP L12, DM L12, DAP DM L12 e DAP DM L6 receberam o tratamento uma vez ao dia, 5 dias por semana durante 2 semanas resultando em um total de 10 aplicações. A aplicação do LBI foi feita ao redor das bordas do ferimento (Figura 8). Durante a primeira semana, a dose do LBI foi aplicada em 6 pontos diferentes ao redor do ferimento utilizando a técnica de aplicação pontual sem contato. Na segunda semana de tratamento foi diminuído para 3 o número de pontos de aplicação utilizando a técnica de varredura. Esse ajuste se fez necessário devido ao tamanho da ferida durante o processo de cicatrização (Tabela 1).

Abaixo segue um resumo detalhado dos grupos experimentais com os procedimentos realizados em cada grupo bem como a intervenção realizada em cada um:

1) Grupo Controle (GC, n=13): animais que passaram por indução de ferimento, sem OAF e sem tratamento com o LBI;

2) Grupo Doença Arterial Periférica (DAP, n=14): animais que passaram pela cirurgia de OAF, indução do ferimento e sem tratamento com o LBI;

3) Grupo Doença Arterial Periférica com LBI 12J (DAP L12, n=14): animais que passaram pela cirurgia de OAF, indução do ferimento e tratamento com LBI com dose de 12J;

4) Grupo Diabetes *Mellitus* (DM, n=13): animais que passaram pela cirurgia de indução do DM, sem a cirurgia de OAF, indução do ferimento e sem o tratamento com o LBI;

5) Grupo Diabetes *Mellitus* com LBI 12J (DM L12, n=12): animais que passaram pela cirurgia de indução do DM, sem a cirurgia de OAF, indução do ferimento e tratamento com o LBI com dose de 12 J;

6) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes *Mellitus* (DAP DM, n=14): animais que passaram pela cirurgia de indução do DM, cirurgia de OAF, indução do ferimento e sem tratamento com LBI;

7) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes *Mellitus* com LBI 12J (DAP DM L12, n=14): animais que passaram pela cirurgia de indução do DM, cirurgia de OAF, indução do ferimento e tratamento com LBI com dose de 12J;

8) Grupo Doença Arterial Periférica + Diabetes *Mellitus* com LBI 6J (DAP DM L6, n=12): animais que passaram pela cirurgia de indução do DM, cirurgia de OAF, indução do ferimento e tratamento com LBI com dose de 6J;

FIGURA 8: TRATAMENTO COM LBI UTILIZANDO O APARELHO PHOTON LASER III (DMC, BRASIL) (ESQUERDA). APLICAÇÃO DO LASER NA FERIDA (DIREITA).



FONTE: a autora.

O protocolo de tratamento com LBI utilizado nas 2 semanas está apresentado na tabela 1.

TABELA 1: PARÂMETROS DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE UTILIZADO NAS 2 SEMANAS DE TRATAMENTO.

Grupo L12	
1ª semana:	
Comp. de onda: 660nm	
Modo de aplicação: contínuo	
Potência: 100mW	
Densidade de energia por ponto: 0,2 J	
Tempo de aplicação por ponto: 2 s	
Tempo total de aplicação: 12s	
Dose por dia: 1,2J	
Dose total: 6J	
Total de pontos: 6	
2ª semana:	
Comp. de onda: 660nm	
Modo de aplicação: contínuo	
Potência: 100mW	
Densidade de energia por ponto: 0,4 J	
Tempo de aplicação por ponto: 4 s	
Tempo total de aplicação: 12s	
Dose por dia: 1,2J	
Dose total: 6J	
Total de pontos: 3	
Grupo L6	
1ª semana:	
Comp. de onda: 660nm	
Modo de aplicação: contínuo	
Potência: 30mW	
Densidade de energia por ponto: 0,2 J	
Tempo de aplicação por ponto: 3 s	
Tempo total de aplicação: 9s	
Dose por dia: 0,6J	
Dose total (5 aplicações): 3J	
Total de pontos: 3	
2ª semana:	
Comp. de onda: 660nm	
Modo de aplicação: contínuo	
Potência: 30mW	
Densidade de energia por ponto: 0,2 J	
Tempo de aplicação por ponto: 3 s	
Tempo total de aplicação: 9s	
Dose por dia: 0,6J	
Dose total (5 aplicações): 3J	
Total de pontos: 3	

LEGENDA: L12: LASER 12 JOULES; L6: LASER 6 JOULES.

FONTE: a autora.

5.8 ZIMOGRAFIA

Após a eutanásia, um fragmento (região cicatrizada) de pele da região onde havia sido feito o ferimento foi pesado e coletado para zimografia, congelada imediatamente com nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer - 80°C até o dia do ensaio. A atividade enzimática de metaloproteinase 2 (MMP-2) foi quantificada através da técnica de zimografia (LA ROCCA et al., 2004; SILVA et al., 2013; TAJHYA; PATEL; BEETON, 2017; TOTH; FRIDMAN, 2001) a partir dos tecidos de pele coletados. Para isso, as amostras foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (composto por 50mM Tris-HCl a pH 7,4; 3,1mM de sacarose e 0,1% Triton X-100) com o auxílio de um sonicador, posteriormente foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm e passaram por quantificação de proteínas por método Bradford (BRADFORD, 1976), feito de acordo com a absorbância da amostra após interação com reagente composto por corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, etanol e ácido fosfórico, para determinar a quantidade a ser depositada no poço do gel. Por fim, 25µg de proteína foram depositadas em cada poço, com tampão de amostra *Laemli*, e separadas por eletroforese por aproximadamente duas horas, a 100 V e limitados a 25 ampere por gel.

As amostras foram depositadas em géis de poliacrilamida na concentração de 8% de Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 contendo 1mg/ml de gelatina, 1,5M Tris (pH 8,8), 1% APS, 0,1% TEMED, 1% SDS. O gel de empacotamento utilizado foi de concentração de 5%, contendo 1,5M Tris (pH 6,8), 1% APS, 0,1% TEMED, 1% SDS. As proteínas foram separadas sob corrente contínua de 100 volts em tampão com as seguintes concentrações: 192mM Glicina; 25mM Tris; 0,1% SDS.

Após eletroforese, os géis foram imersos em Solução de Triton (2,5% Triton X-100; 50mM Tris, pH 7,4; 5mM CaCl₂), para remoção do SDS, e colocados no agitador por 1 hora com troca de solução a cada 20 minutos. Em seguida, os géis foram imersos em Solução de Incubação [50mM Tris (pH 7,4); 5mM CaCl₂; 150mM NaCl], para ativação das MMPs a uma temperatura de 37°C por 20 horas. Após a incubação, foi realizada a coloração com Corante Coomassie Blue (0,5% Coomassie blue em 30% metanol e 10% Ácido acético). Os géis foram submersos no corante por 30 minutos, em agitação. Em seguida, foi realizada a descoloração (35% Metanol; 10% Ácido Acético), durante 20 minutos e depois os géis foram colocados em água destilada até a digitalização.

Para análise densitométrica, os géis foram digitalizados e a determinação da atividade enzimática das MMPs foi realizada pela intensidade das bandas claras contra um fundo azul (nível de degradação) e identificada de acordo com a massa molecular conforme descrito anteriormente (SILVA et al., 2014; SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005; WYSOCKI; STAIANO-COICO; GRINNELL, 1993) no software *ImageJ 1.46* (NIH). Os dados são obtidos em unidades arbitrárias baseado na quantidade de *pixels* da imagem. A intensidade das bandas dos grupos DAP, DAP L12, DAP DM, DAP DM L12, DAP DM L6 foram normalizadas de acordo com uma banda referente a um *pool* de amostras de 6 animais do grupo controle para demonstração em porcentagem de acordo com o seguinte cálculo:

$$\%MMP2 = 100 \times \left(\frac{\text{expressão de MMP2}}{\text{expressão de MMP2pool}} \right)$$

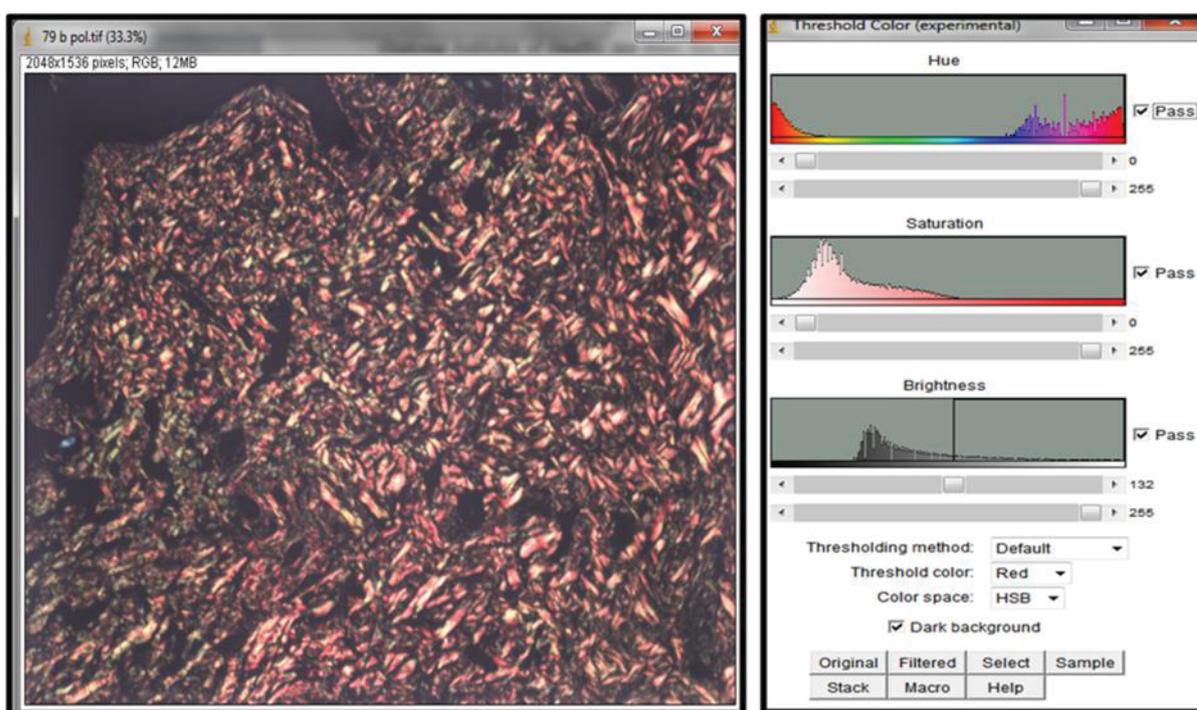
5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Um fragmento da pele da região onde foi feito o ferimento também foi coletado para análise histológica da quantidade de colágeno na derme. As amostras foram fixadas em formalina 10%, desidratadas, emblocadas, cortadas (7 μm) e montadas em lâminas histológicas posteriormente coradas com Hematoxilina-eosina e Picro Sirius eosina (PSR) por protocolos convencionais. O registro fotográfico das lâminas foi feito em microscópio de luz polarizada (marca Nikon, modelo Eclipse E 200), com câmera digital (Biocam). Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de colágeno e a espessura das fibras, de acordo com método previamente descrito (RICH; WHITTAKER, 2005; SILVA et al., 2017).

As fibras de colágeno, quando coradas com PSR e analisadas sob luz polarizada, apresentam coloração distinta de acordo com sua espessura e o tipo de colágeno, variando da cor verde (colágeno tipo III, mais delgado), para o amarelo, laranja e para o vermelho (colágeno tipo I, mais espesso, respectivamente) (HISS et al., 1988; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982). As imagens das lâminas foram analisadas no *ImageJ 1.46* (NIH), por meio das cores dos pixels, onde foi gerado um histograma de 256 cores possíveis (Figura 9), separadas de acordo com os seguintes intervalos: vermelho de 2-9 e 230-256, laranja de 10-38, amarelo de 39-51 e verde de 51-128 (RICH; WHITTAKER, 2005). Quando uma cor específica era destacada dentro do histograma de cores, a área formada por todos os pixels

daquele determinado intervalo era selecionada e quantificada, para depois ser transformada em porcentagem em relação à quantidade total de pixels de todos os intervalos somados.

FIGURA 9: ANÁLISE DE LÂMINA DE PELE NO IMAGEJ CORADA COM PICROSIRUS RED CAPTADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ POLARIZADA.



FONTE: a autora.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados no *Graphpad Prism*. Os resultados de cicatrização foram verificados através de regressão não-linear para estimar o tempo (dias) que as feridas cutâneas levaram para cicatrizar 25%, 50% e 75%. Para isso os dados foram ajustados em uma equação não-linear utilizando função sigmoide, restringindo o valor inicial e topo em 0 e 100, respectivamente. Para o tempo até a cicatrização foi calculado o EC25, EC50 e EC75. Os dados são apresentados com 95% do intervalo de confiança. Para confirmação da diferença entre grupos nestes pontos citados foi usado análise de variância (ANOVA) de uma via com post hoc de Tukey.

Para a quantificação do colágeno foi usado o teste de Shapiro Wilk para testar a normalidade dos grupos. Quando os dados não foram normais foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram realizadas 2 comparações, uma para avaliar o Efeito da Doença entre os grupos Controle, DAP, DM e DAP DM onde foi analisado através da ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. A segunda comparação foi para avaliar o Efeito do Laser entre os grupos que receberam o tratamento com o LBI. Entre os grupos (DAP-DAP L12 e DM-DM L12) foi usado o teste t e para os dados que não obtiveram distribuição normal foi usado o teste de Mann-Whitney. Entre os grupos DAP DM, DAP DM L12, DAP DM L6 foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou ANOVA de 1 via para dados paramétricos com pos hoc de Tukey.

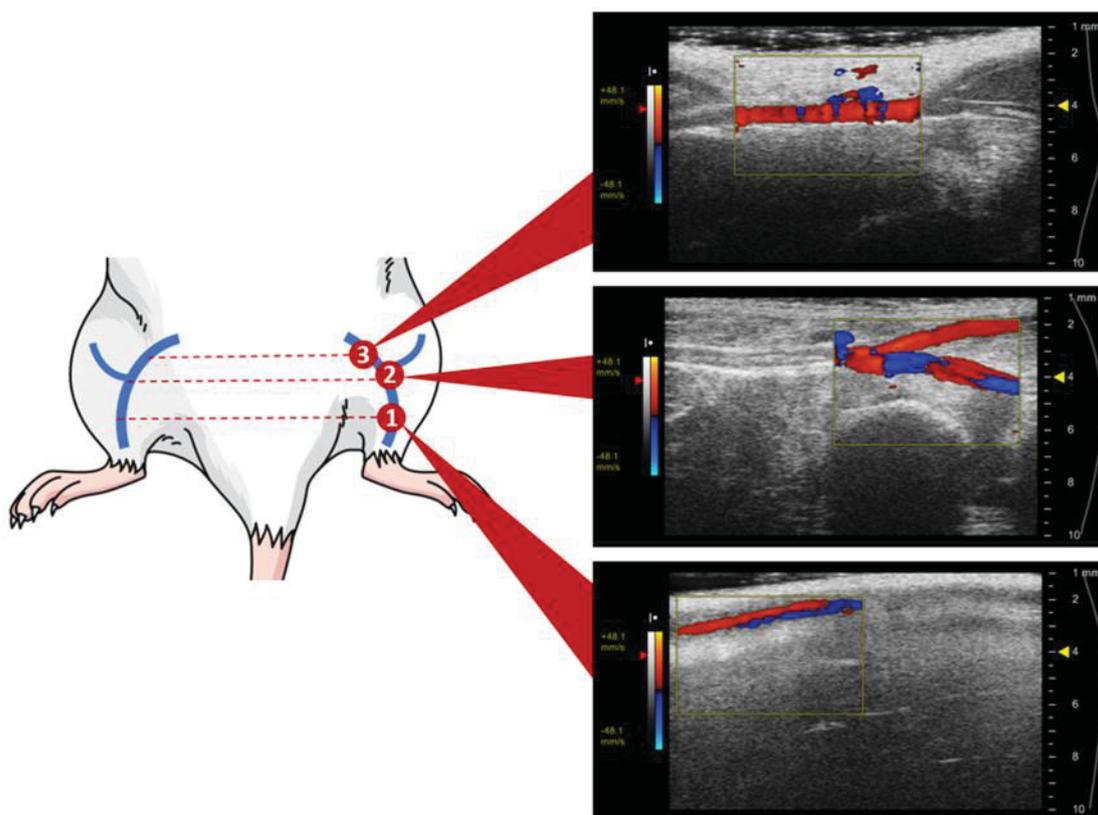
Em relação à atividade de metaloproteinase-2, como o número de amostras em cada grupo foi pequeno, foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos grupos. A análise foi feita através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou teste Mann-Whitney quando a comparação era normal entre dois grupos. O valor para significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 FLUXO DOS VASOS DE MEMBRO INFERIOR

Foi realizado exame de ecodoppler em 13 animais, onde 6 passaram por cirurgia de oclusão de artéria femoral e os outros 7 foram controle. A avaliação de fluxo dos vasos dos membros pélvicos foi feita bilateralmente onde foram captadas imagens em três locais diferentes do membro pélvico, com avaliação de fluxo de veias e artérias safena (porção distal e proximal), epigástrica superficial e femoral (Figura 10).

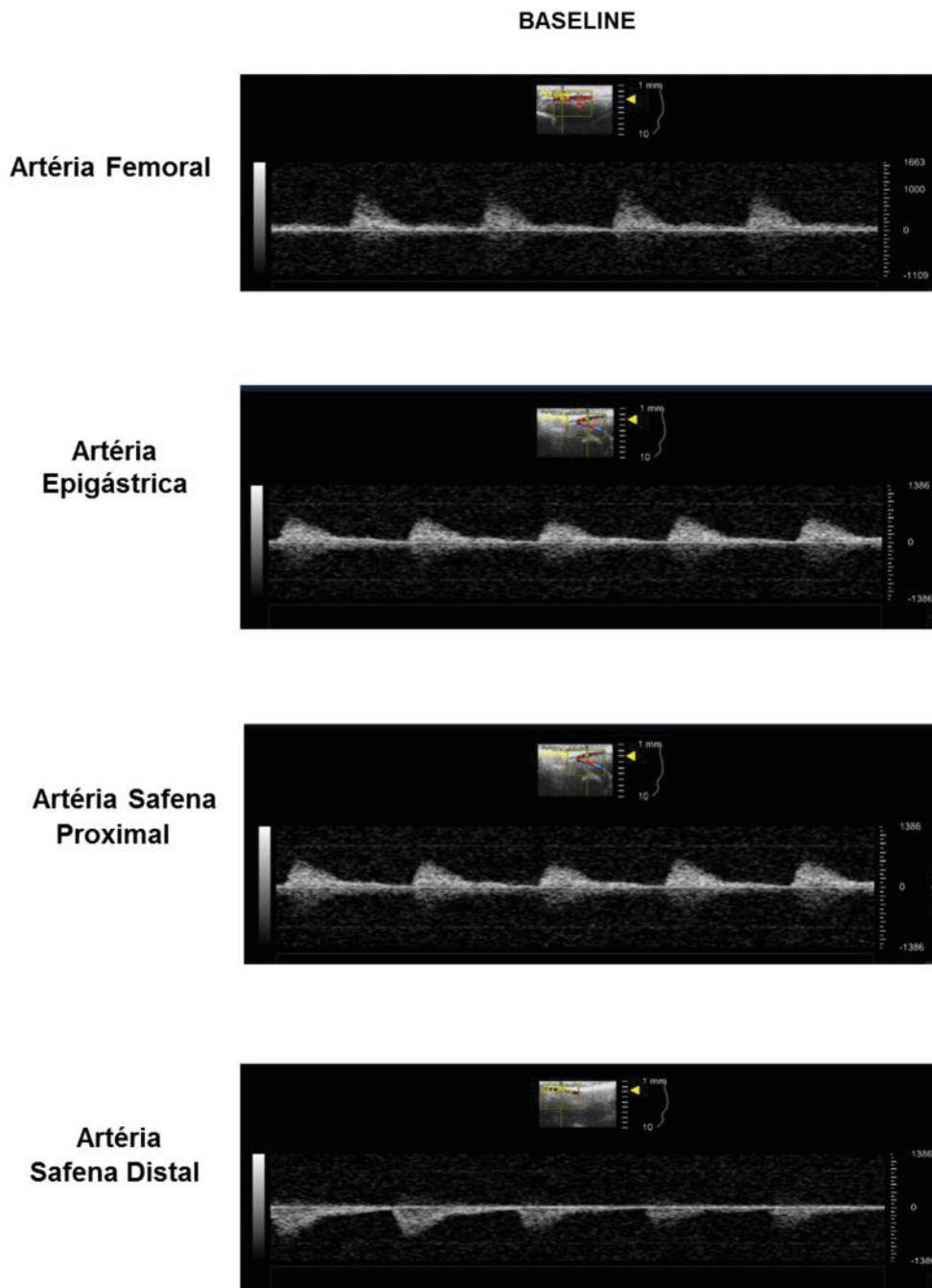
FIGURA 10: IMAGENS DE ULTRASSONOGRAFIA COM ECODOPPLER CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES SEGMENTOS ANALISADOS EM ANIMAL CONTROLE.



LEGENDA: Na imagem 1 está destacado o fluxo da porção distal da veia e artéria safena. Na imagem 2 pode-se observar o fluxo da porção proximal da veia e artéria safena (segmento em vermelho e azul, inferior) e da veia epigástrica superficial (segmento vermelho, superior). Na imagem 3 observa-se o fluxo da veia femoral.

FONTE: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Laboratório de Cardiologia da Universidade de Illinois em Chicago (UIC).

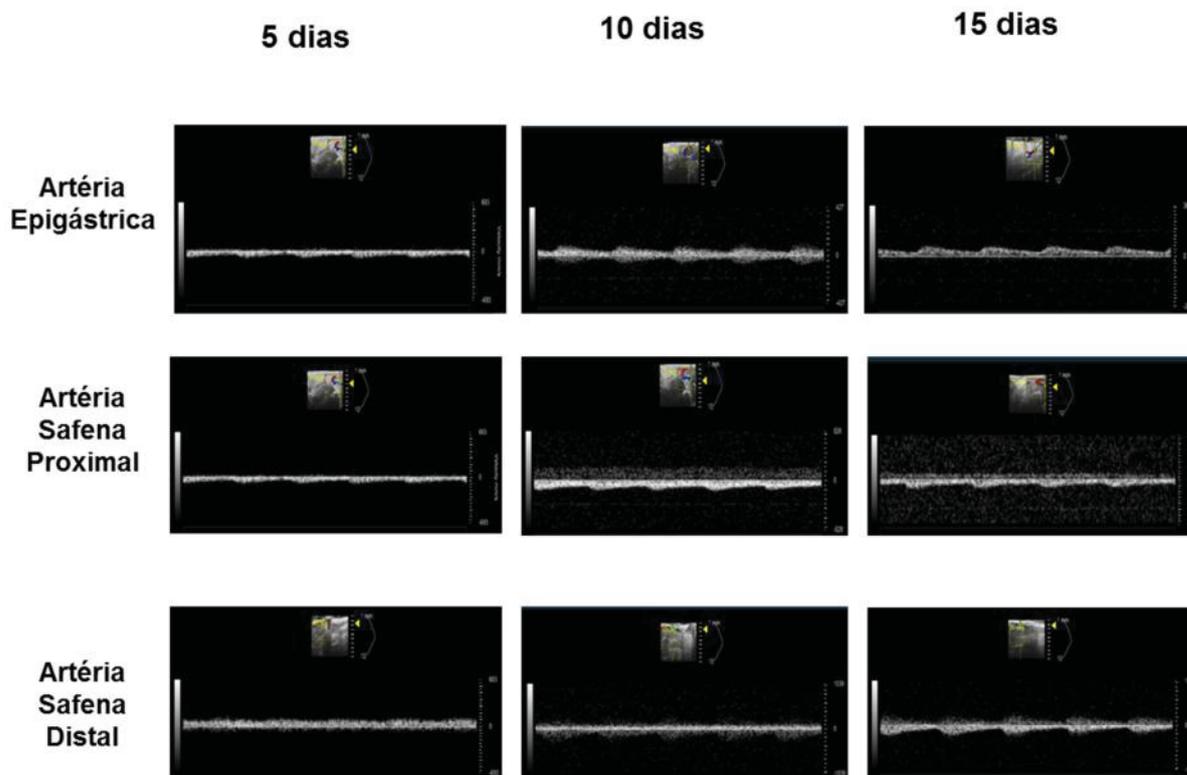
FIGURA 11: IMAGENS DE ECODOPPLER MOSTRANDO O FLUXO ARTERIAL EM RATO ANTES DA OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.



LEGENDA: De cima para baixo, respectivamente estão representados os fluxos da porção femoral, da epigástrica superficial, da porção proximal e distal da safena.

FONTE: Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Illinois em Chicago (UIC).

FIGURA 12: IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL QUE PASSOU POR OCLUSÃO DE ARTÉRIA FEMORAL (OAF) 5, 10 E 15 DIAS APÓS A CIRURGIA.

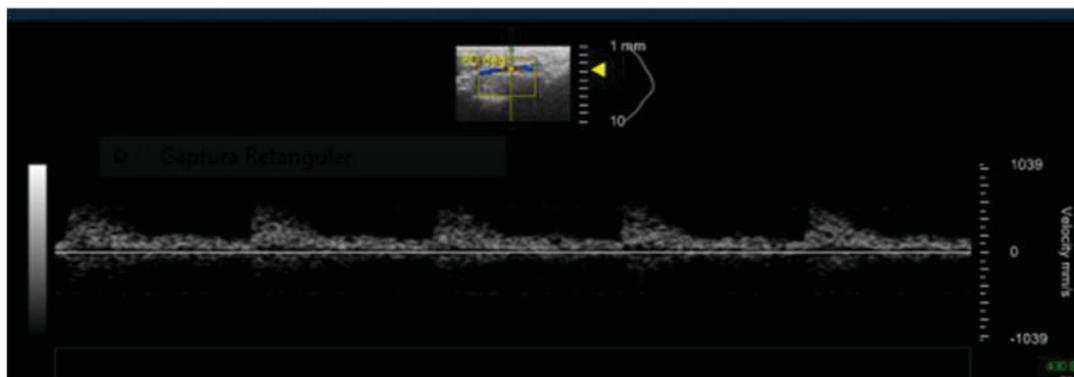


LEGENDA: Notamos ausência de fluxo nos segmentos arteriais abaixo da femoral. De cima para baixo, respectivamente estão representados os fluxos da porção da epigástrica superficial, da porção proximal e distal da safena.

FONTE: Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Illinois em Chicago (UIC).

A Figura 11 mostra imagens do fluxo arterial do membro pélvico de animal antes da realização da cirurgia de obstrução da artéria femoral (OAF) e na Figura 12 as imagens de um animal que passou pela OAF. Não há imagem da artéria femoral pois não foi observado fluxo arterial e pode-se observar pela imagem que nos segmentos abaixo da femoral (epigástrica, safena proximal e distal) também não foram observados fluxo arterial demonstrando assim a eficácia do modelo da cirurgia de obstrução da artéria femoral. Em alguns animais foi observado no 15º dia após a cirurgia um fluxo denominado *Parvus Tardus* que é indicativo de estenose do vaso (Figura 13).

FIGURA 13: IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL NO 15° APÓS A CIRURGIA DE OCLUSÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.



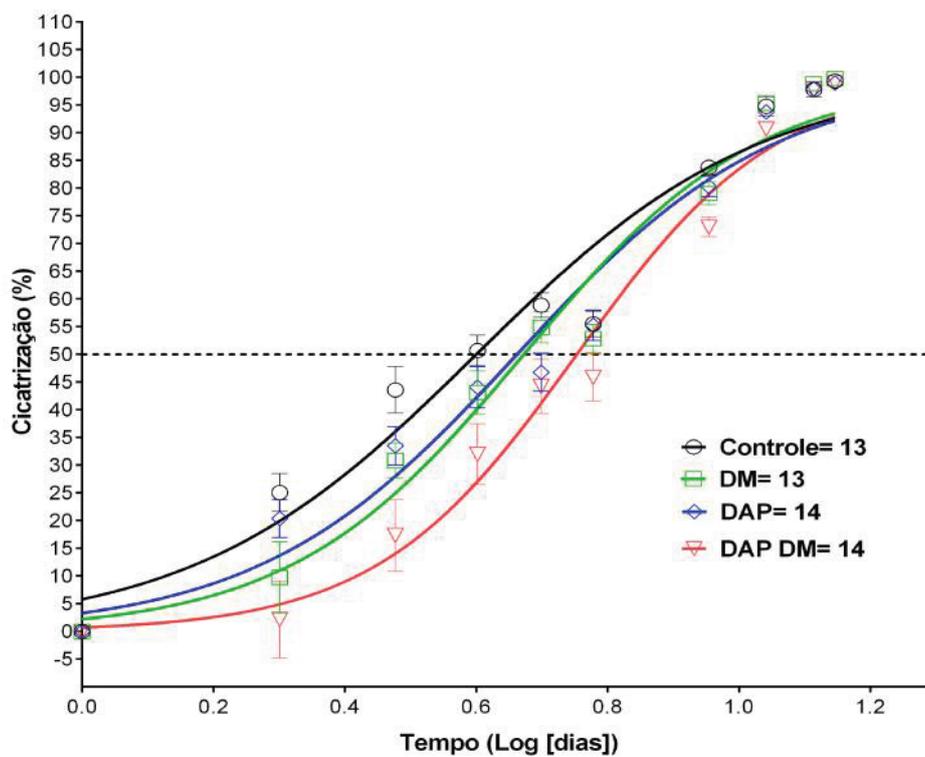
LEGENDA: Essa imagem é típica de um fluxo denominado *Parvus Tardus*.

FONTE: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Laboratório de Cardiologia, da Universidade de Illinois em Chicago (UIC).

6.2 CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS

Foram feitas 2 análises em relação às medidas das áreas das feridas captadas durante as 2 semanas do protocolo de intervenção com o Laser de Baixa Intensidade. Na primeira foi analisado o efeito da Doença (Doença Arterial Periférica-DAP, Diabetes Mellitus-DM e Doença Arterial e Diabetes Mellitus-DAP DM) em relação à porcentagem de cicatrização das feridas dos grupos durante os 10 dias de tratamento (Figura 14). Pode-se observar que os grupos DAP e DM demoraram mais tempo para atingir 25% e 50% de cicatrização quando comparados ao grupo controle, sendo que o grupo DM cicatrizou mais lentamente que o grupo DAP. Depois das feridas cicatrizadas em 50% não houve diferença significativa em 75% da cicatrização. Em relação ao grupo DAP DM existe diferença significativa quando comparado com os outros grupos. Esse grupo demora mais tempo para cicatrizar a ferida em 25% e 50% em relação aos outros grupos. Existe diferença significativa para atingir 75% da cicatrização somente quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

FIGURA 14: EFEITO DA DOENÇA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS DM, DAP E DAP DM COMPARADOS COM O GRUPO CONTROLE.



LEGENDA: DM: Diabetes Mellitus; DAP: Doença Arterial Periférica. DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus.

FONTE: a autora.

TABELA 2: RESULTADOS DO EFEITO DA DOENÇA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS DM, DAP E DM COMPARADOS COM O GRUPO CONTROLE.

Controle						
	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,3636	0,01999	0,3240 to 0,4032	2,310		2,109 to 2,530
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,6001	0,01236	0,5757 to 0,6246	3,982	0,1133	3,758 to 4,207
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,8367	0,01538	0,8062 to 0,8672	6,866		6,401 to 7,365
DM						
	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,4774*	0,01810	0,4419 to 0,5128	3,002*		2,766 to 3,257
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,6723*	0,01168	0,6494 to 0,6952	4,702*	0,1264	4,455 to 4,950
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,8673	0,01593	0,8361 to 0,8985	7,367		6,856 to 7,916
DAP						
	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,4465*	0,01727	0,4127 to 0,4804	2,796*		2,586 to 3,023
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,6621*	0,01099	0,6406 to 0,6837	4,593*	0,1162	4,365 to 4,821
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,8777	0,01455	0,8492 to 0,9062	7,546		7,066 to 8,058
DAP+DM						
	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,5856#	0,01916	0,5481 to 0,6232	3,851#		3,532 to 4,199
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,7532#	0,01323	0,7272 to 0,7791	5,664#	0,1725	5,326 to 6,003
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,9207*	0,01808	0,8853 to 0,9561	8,331*		7,679 to 9,039

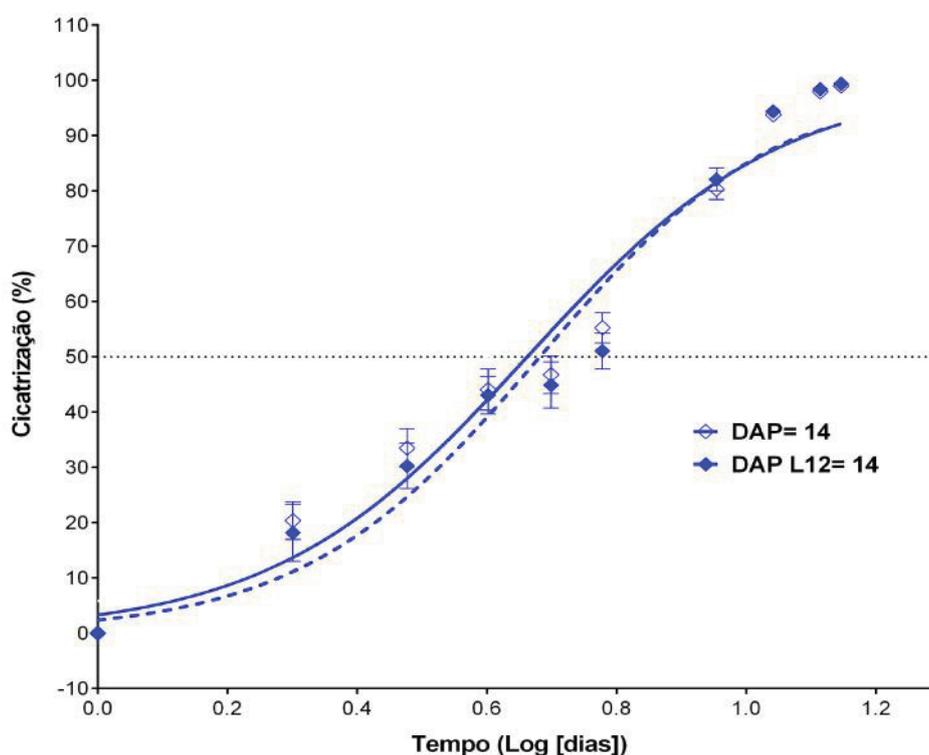
* Diferente do controle, # Diferente de todos os grupos

LEGENDA: DM: Diabetes Mellitus; DAP: Doença Arterial Periférica; DAP+DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus. * Diferente do controle; # Diferente de todos os grupos.

FONTE: a autora.

Na segunda análise foi considerado o efeito do LBI 12J em relação à porcentagem de cicatrização das feridas durante os 10 dias de tratamento. A figura 15 mostra o efeito do LBI na cicatrização de feridas de animais com DAP, a figura 16 mostra o efeito do LBI na cicatrização de feridas no grupo DM e a figura 17 mostra o efeito das 2 doses aplicadas do LBI na cicatrização de feridas no grupo DAP DM. Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao Efeito do Laser, nesta dose, no grupo Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus (Tabelas 3 e 4).

FIGURA 15: EFEITOS DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.



LEGENDA: DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules.

FONTE: a autora.

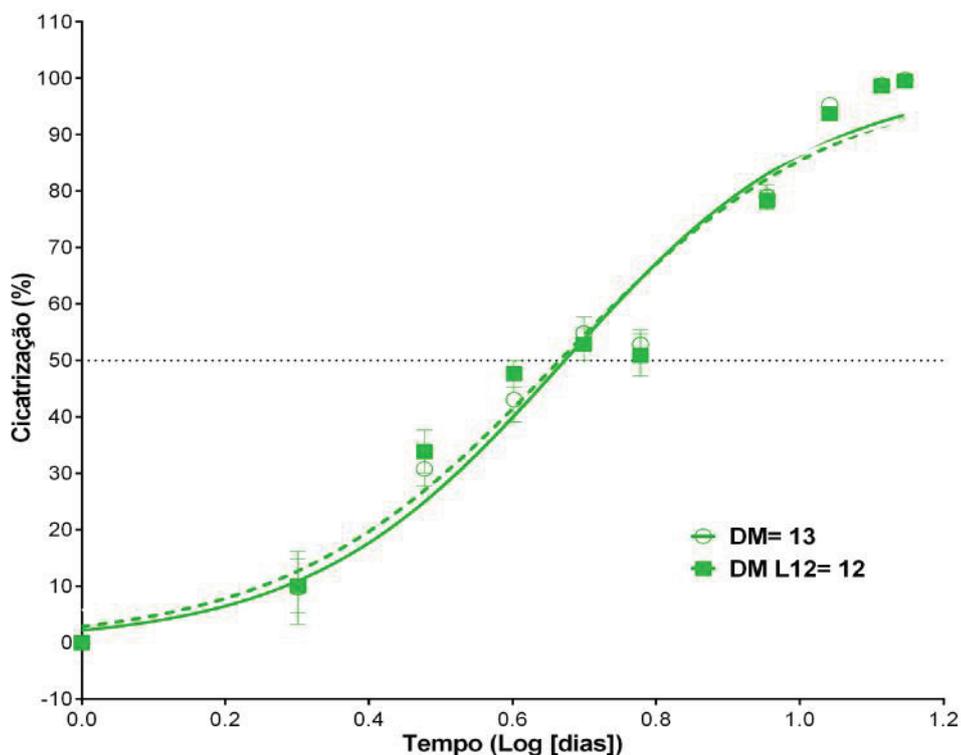
TABELA 3: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.

DAP						
<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI	
0,4465	0,01727	0,4127 to 0,4804	2,796		2,586 to 3,023	
<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI	
0,6621	0,01099	0,6406 to 0,6837	4,593	0,1162	4,365 to 4,821	
<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI	
0,8777	0,01455	0,8492 to 0,9062	7,546		7,066 to 8,058	
DAP+12J						
<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI	
0,4799	0,01899	0,4427 to 0,5172	3,020		2,772 to 3,290	
<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI	
0,6815	0,01222	0,6575 to 0,7054	5,803	0,1352	4,538 to 5,068	
<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI	
0,8830	0,01608	0,8515 to 0,9145	7,639		7,104 to 8,214	

LEGENDA: DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules.

FONTE: a autora

FIGURA 16: EFEITO DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DIABETES MELLITUS.



LEGENDA: DM: Diabetes *Mellitus*; DM L12: Diabetes *Mellitus* e Laser 12 joules.

FONTE: a autora.

TABELA 4: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DIABETES MELLITUS.

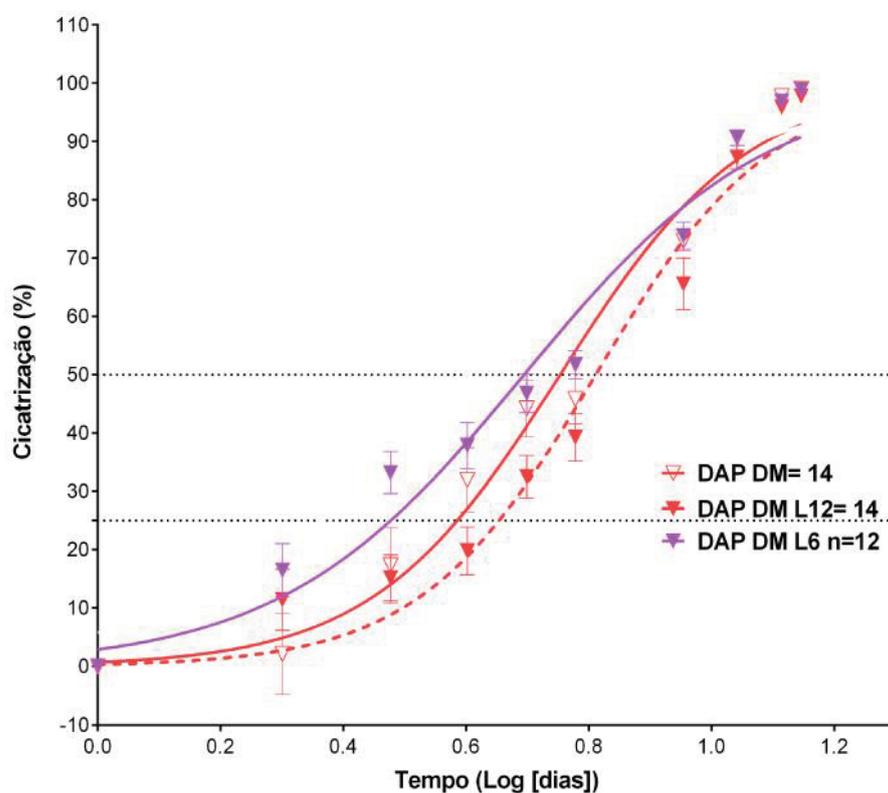
DM						
<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI	
0,4774	0,01810	0,4419 to 0,5128	3,002		2,766 to 3,257	
<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI	
0,6723	0,01168	0,6494 to 0,6952	4,702	0,1264	4,455 to 4,950	
<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI	
0,8673	0,01593	0,8361 to 0,8985	7,367		6,856 to 7,916	
DM+12J						
<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI	
0,4571	0,01832	0,4208 to 0,4934	2,865		2,635 to 3,115	
<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI	
0,6650	0,01167	0,6419 to 0,6882	4,624	0,1243	4,378 to 4,870	
<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI	
0,8730	0,01590	0,8415 to 0,9045	7,464		6,942 to 8,025	

LEGENDA: DM: Diabetes *Mellitus*; DM L12: Diabetes *Mellitus* e Laser 12 joules.

FONTE: a autora.

Quando associamos as 2 doenças, o grupo DAP DM L12 mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo que não teve o tratamento (Figura 17). O grupo que teve o tratamento com o Laser de 12 joules levou mais tempo para cicatrizar 50% da ferida quando comparado ao grupo que não obteve o tratamento. Foi encontrado diferença significativa no grupo DAP DM L6 quando comparado aos outros grupos. Esse grupo obteve 25% e 50% de cicatrização mais rápido do que o grupo tratado com L12 e o grupo sem o tratamento (Tabela 6).

FIGURA 17: EFEITOS DO LASER (L12 E L6) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA E DIABETES *MELLITUS*.



LEGENDA: DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus*; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com Laser 6 joules.

FONTE: a autora.

TABELA 5: RESULTADOS DO EFEITO DO LASER (L12 E L6) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DOS GRUPOS COM DAP E DM.

DAP+DM	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,5856	0,01916	0,5481 to 0,6232	3,851		3,532 to 4,199
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,7532	0,01323	0,7272 to 0,7791	5,664	0,1725	5,326 to 6,003
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,9207	0,01808	0,8853 to 0,9561	8,331		7,679 to 9,039
DAP+DM+12J	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,6535	0,01572	0,6227 to 0,6844	4,503		4,195 to 4,835
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,8110*	0,01128	0,7889 to 0,8331	6,472*	0,1680	6,143 to 6,801
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,9685	0,01518	0,9388 to 0,9983	9,301		8,685 to 9,961
DAP+DM+6J	<u>LogEC25</u>	SE	CI	EC25	SE	CI
	0,4771#	0,01844	0,4406 to 0,5136	3,000#		2,758 to 3,263
	<u>LogEC50</u>	SE	CI	EC50	SE	CI
	0,6944#	0,01183	0,6709 to 0,7178	4,947#	0,1348	4,680 to 5,214
	<u>LogEC75</u>	SE	CI	EC75	SE	CI
	0,9116	0,01629	0,8794 to 0,9439	8,159		7,575 to 8,788

* Diferente de DAP+DM, # Diferente dos demais grupos

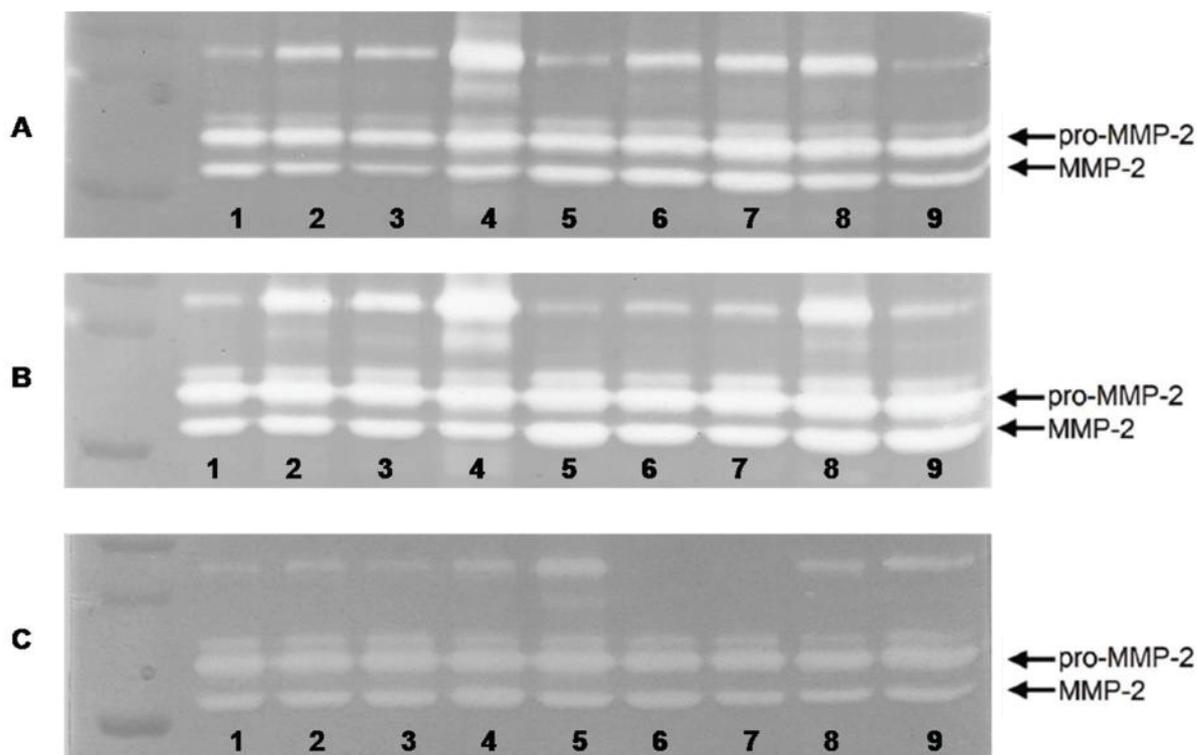
LEGENDA: DAP+DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus*; DAP+DM+12J: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com Laser 12 joules; DAP+ DM+L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes *Mellitus* com Laser 6 joules. *Diferente de DAP+DM, # Diferente dos demais grupos.

FONTE: a autora.

6.3 ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE 2 DA PELE

Foram coletadas amostras de pele da região posterior da coxa de 30 animais para a análise da atividade de MMP-2. Os grupos analisados foram DAP, DAP L12, DAP DM, DAP DM L12, DAP DM L6 com 6 amostras de cada grupo. Esses grupos foram normalizados a partir de um *pool* de amostras de 6 animais do grupo controle. As atividades da pró-enzima (pro-MMP-2) e da metaloproteinase 2 (MMP-2) podem ser observadas na figura 18 em amostras de cada grupo analisado. Os resultados demonstraram aumento da expressão da pró-enzima (pro-MMP-2) no grupo DAP DM L6 quando comparado aos outros grupos (Figura 19). Não foram encontradas diferenças significativas na atividade da MMP-2 entre os grupos (Figura 20.)

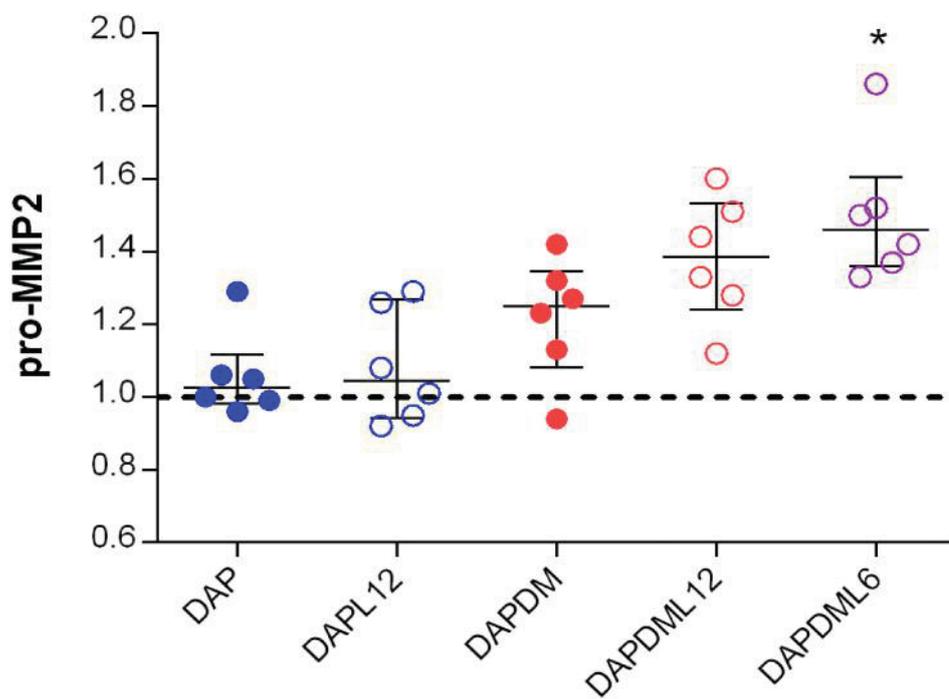
FIGURA 18: GEIS DE ZIMOGRRAFIA MOSTRANDO A ATIVIDADE DA PRO-ENZIMA (PRO-MMP2) E METALOPROTEINASE-2 (MMP-2).



LEGENDA: Gel A, n.1 refere-se ao pool de amostras do grupo controle, n. 2-5 refere-se a amostras do grupo DAP DM, n. 6-9 refere-se a amostras do grupo DAP DM L6. Gel B, n.1 refere-se ao pool de amostras do grupo controle, n. 2-5 refere-se a amostras do grupo DAP DM, n. 6-9 refere-se a amostras do grupo DAP DM L12. Gel C, n.1 refere-se ao pool de amostras do grupo controle, n. 2-5 refere-se a amostras do grupo DAP, n. 6-9 refere-se a amostras do grupo DAP L12. DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 6 joules; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes mellitus com Laser 12 joules; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DAP: Doença Arterial Periférica.

FONTE: a autora.

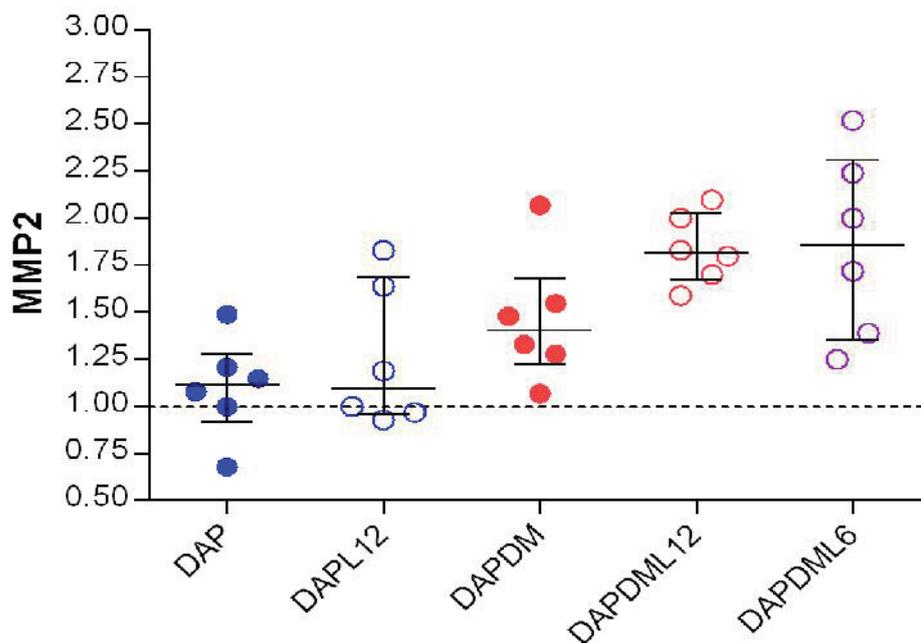
FIGURA 19: ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE-2, PRO-ENZIMA (PRO-MMP2) NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE.



LEGENDA: DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes mellitus com Laser 6 joules. * representa diferença significativa quando comparado aos outros grupos.

FONTE: a autora.

FIGURA 20: ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE-2 (MMP2) NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE.



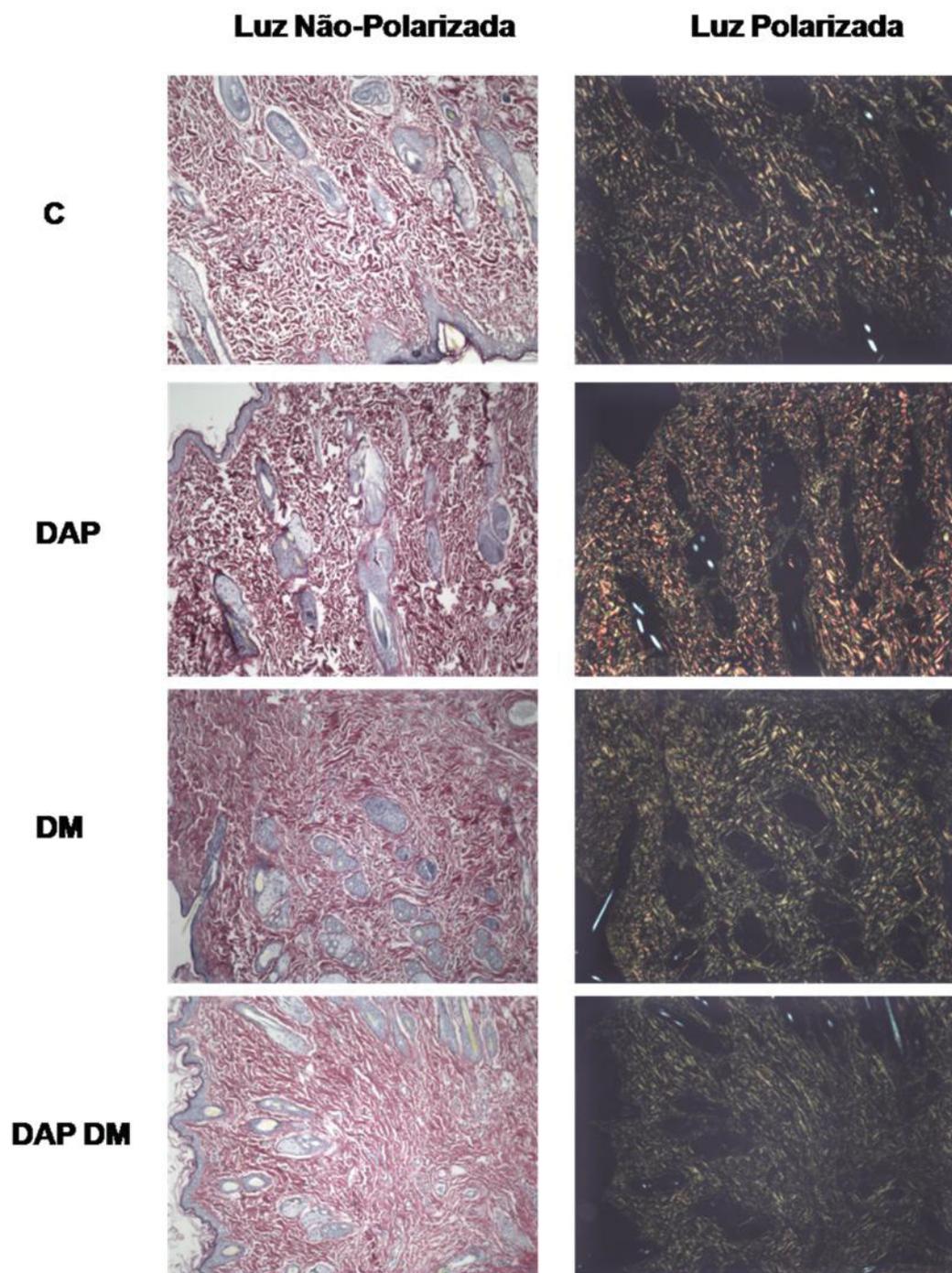
LEGENDA: DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 6 joules.

FONTE: a autora.

6.4 QUANTIFICAÇÕES DO COLAGENO

Foram captadas imagens de lâminas de pele de 56 animais em microscópio de luz não-polarizada e polarizada (Figuras 21 e 22). Assim como foram feitos com os resultados de cicatrização das feridas, a análise da distribuição das fibras de colágeno por cor foi feita em relação ao efeito da Doença (Controle, DAP, DM e DAP DM) e ao efeito do Laser na DAP e DM e, efeito do laser nas 2 doenças associadas. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das análises de colágenos realizadas (Figura 23). E em relação a proporção de colágeno tipo I e III, não houve diferença significativa entre os grupos para os 2 tipos de colágenos (Figura 24).

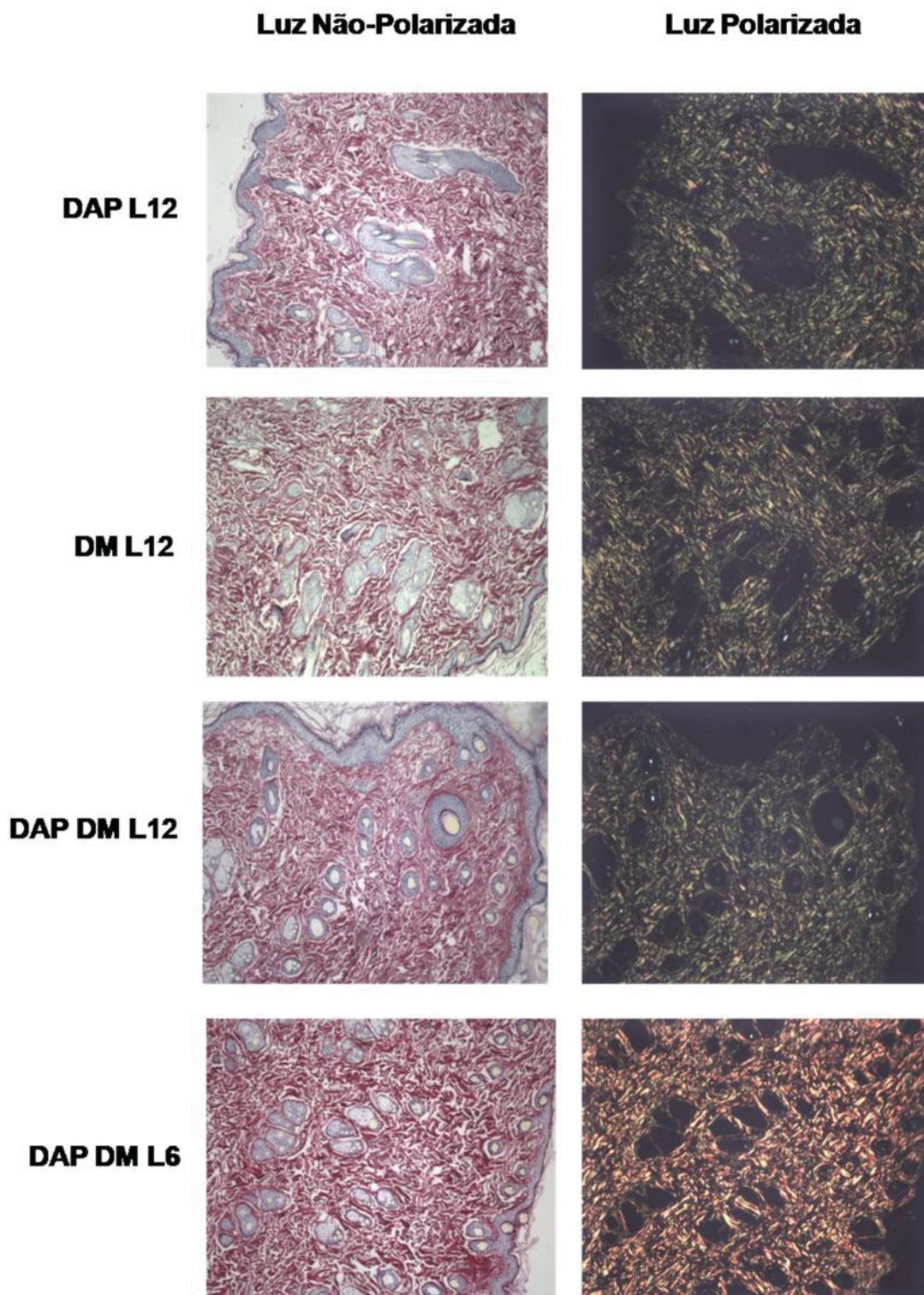
FIGURA 21: FOTOMICROGRAFIAS DA PELE CICATRIZADA DE RATOS WISTAR CORADAS COM *PICRO SIRIUS RED* COM AUMENTO DE 10X.



LEGENDA: À esquerda as imagens foram digitalizadas com microscópio de luz não-polarizada e à direita com luz polarizada. C: Controle; DAP: Doença Arterial Periférica; DM: Diabetes Mellitus; DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus.

FONTE: a autora.

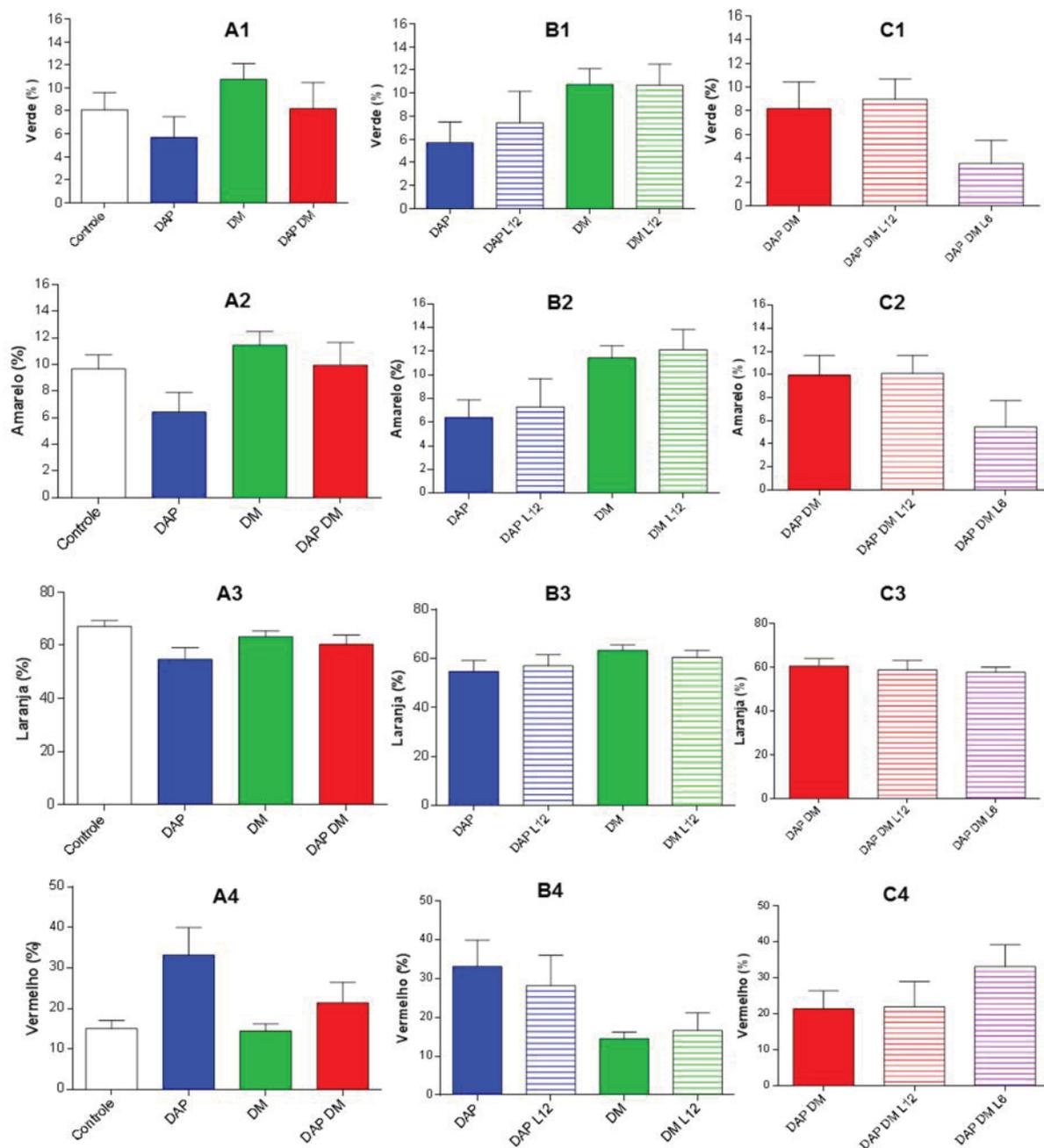
FIGURA 22: FOTOMICROGRAFIAS DA PELE CICATRIZADA DE RATOS WISTAR CORADAS COM *PICRO SIRIUS RED* COM AUMENTO DE 10X.



LEGENDA: À esquerda as imagens foram digitalizadas com microscópio de luz não-polarizada e à direita com luz polarizada. DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DM L12: Diabetes Mellitus e Laser 12 joules; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 6 joules.

FONTE: a autora.

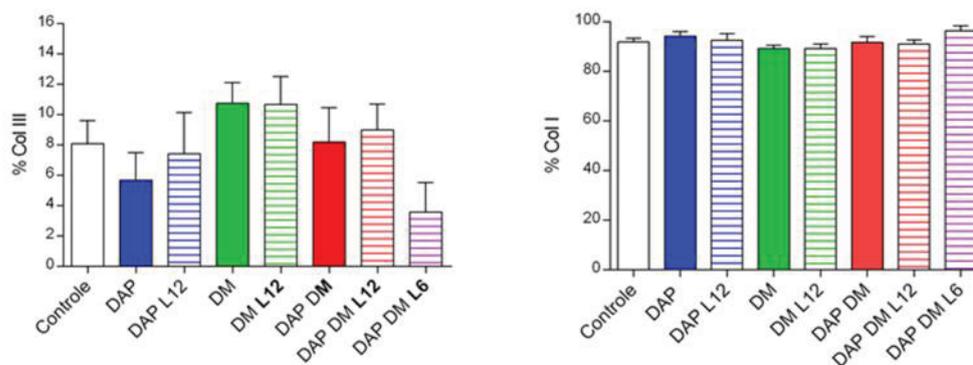
FIGURA 23: DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGENO SEPARADAS POR CORES DAS LÂMINAS CORADAS COM O *PICRO SIRIUS RED*.



LEGENDA: Os gráficos A1-4 mostram a distribuição do colágeno em relação ao efeito das doenças nos grupos (controle, DAP, DM e DAP DM). Os gráficos B1-B4 mostram a distribuição do colágeno em relação ao efeito do Laser nos grupos com DAP e DM. Os gráficos C1-C4 mostram a distribuição do colágeno em relação ao efeito do laser nas 2 doses (L12 e L6) quando as 2 doenças estão associadas (DAP DM). DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DM: Diabetes Mellitus; DM L12: Diabetes Mellitus e Laser 12 joules; DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 6 joules.

FONTE: a autora.

FIGURA 24: PORCENTAGEM DE COLAGENO TIPO I E III NA DERME.



LEGENDA: DAP: Doença Arterial Periférica; DAP L12: Doença Arterial Periférica e Laser 12 joules; DM: Diabetes Mellitus; DM L12: Diabetes Mellitus e Laser 12 joules; DAP DM: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus; DAP DM L12: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 12 joules; DAP DM L6: Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus com Laser 6 joules.

FONTE: a autora.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi apresentado um modelo de obstrução total e unilateral da artéria femoral com o objetivo de investigar as repercussões hemodinâmicas para melhor estudar a evolução da Doença Arterial Periférica (DAP) e encontrar formas de tratamento para os sintomas provocados por essa doença. O estudo desse modelo associado a um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da DAP, o Diabetes Mellitus, combinação comumente presente em pacientes com diabéticos com lesões cutâneas dos pés, condição clínica denominada de pé diabético, investigou o impacto destas condições na cicatrização de feridas de pele e permitiu a investigação de parâmetros mais concretos para utilização de um recurso fototerapêutico para acelerar o processo cicatricial.

Através de uma análise qualitativa foi possível demonstrar por meio de ultrassonografia com ecodoppler que a oclusão realizada na artéria femoral levou a ausência de fluxo sanguíneo durante as duas semanas de avaliação. Assim, foi possível evidenciar que o modelo proposto foi eficaz bloqueando o fluxo sanguíneo para o membro pélvico e simulando um quadro de Doença Arterial Periférica. Para realizar medidas quantitativas seriam necessários os dados de velocidade do fluxo sanguíneo, porém não foi possível a aquisição desse dado através do Ecodoppler, devido às dificuldades técnicas e predominantemente pela ausência de fluxo ou presença de fluxo de intensidade não precisamente quantificável. Alguns fatores como o posicionamento do transdutor do ultrassom e a pressão exercida sobre a área do exame influenciariam os dados obtidos de velocidade do fluxo e assim a resposta obtida não seria fidedigna para uma análise entre os grupos usados no estudo. Apesar disso, pode-se afirmar que o modelo proposto se mostrou eficaz diante de uma mortalidade extremamente baixa e que através dele foi possível realizar o tratamento durante as 2 semanas. Adicionalmente, a diminuição de fluxo impactou a cicatrização das feridas experimentais demonstrando um déficit circulatório cutâneo.

Existem alguns modelos animais de isquemia dos membros pélvicos propostos na literatura que buscam encontrar estratégias de tratamento, na maioria das vezes de forma farmacológica ou terapia diferenciadas, na tentativa de encontrar soluções alternativas aos tradicionais procedimentos cirúrgicos

empregados pela Medicina e buscando assim restaurar a perfusão dos membros isquêmicos. Diferentemente do modelo proposto, outros estudos usam modelos, por exemplo de obstrução por ligadura da artéria ilíaca comum e artéria femoral permitindo identificar através de índices de pulsatilidade do fluxo sanguíneo o efeito de terapias após isquemia (XU et al., 2018). Alguns modelos, visando mimetizar a Doença Arterial Periférica, ao invés de obstruírem a artéria femoral utilizam a obstrução por ligadura da artéria ilíaca comum logo abaixo da bifurcação da aorta com o intuito, por exemplo, de analisar a performance muscular que é comprometida na DAP (MILKIEWICZ et al., 2006; WATANABE et al., 2017). Pipinos et al. descrevem um modelo de isquemia de membros pélvicos em camundongos no qual realizam o método de obstrução em 2 etapas onde na primeira realizam a obstrução por ligadura da artéria femoral com a epigástrica e depois de 2 semanas finalizam a obstrução por ligação com a ilíaca abaixo da bifurcação da aorta deixando o animal nessa condição durante 4 semanas (PIPINOS et al., 2008).

Como pôde-se observar, existem alguns estudos relatando modelos animais de isquemia de membros pélvicos, causando uma insuficiência arterial simulando assim a Doença Arterial Periférica. Se esta não for diagnosticada precocemente pode-se agravar e se não tratada de forma correta aparecem alguns sintomas devido à falta de perfusão local, que são as úlceras cutâneas. Diante disso, além do modelo de insuficiência arterial procurou-se agregar a ele a indução de uma úlcera de origem arterial buscando assim uma condição que se assemelhasse o mais próximo da condição clínica de um indivíduo.

A relevância do nosso estudo utilizando o modelo animal de Doença Arterial Periférica se dá pelo fato de que, até o momento, não há estudos que relacionem esse modelo com a presença de uma ferida cutânea na região posterior ipsilateral ao procedimento cirúrgico. Porém, é importante ressaltar que a cicatrização de feridas cutâneas em ratos não é perfeitamente semelhante à cicatrização de feridas cutâneas em humanos porque a morfologia da pele é diferente e, portanto, a região do ferimento e as condições locais devem ser levadas em consideração (DORSETT-MARTIN, 2004). Outro diferencial do nosso estudo seria a região onde foi realizada a ferida no animal. A maioria dos estudos que buscam investigar o processo de cicatrização faz o ferimento na região dorsal do animal (DOGAN et al., 2017; TUK et al., 2014; KORELO et al., 2016), diferentemente do presente estudo que se propôs a

investigar a cicatrização do ferimento na região próxima ao procedimento cirúrgico realizado no animal.

Quanto à cicatrização das feridas, pode-se observar que a associação das 2 condições, Doença Arterial Periférica e Diabetes Mellitus, levam mais tempo para atingir 50% de cicatrização da ferida em relação aos modelos de DAP e DM estudados isoladamente. Este atraso na cicatrização pode ser explicado principalmente pela presença do diabetes e por esta estar associada a uma variedade de anormalidades no tecido conectivo, inibição da resposta inflamatória, defeitos no colágeno, além do estresse oxidativo, hipercolesterolemia, hiperglicemia (ROSENBAUM et al.,2012). O objetivo de realizar esta combinação de condições foi mimetizar a condição clínica relativamente frequente, denominada de pé diabético, que ocorre em pacientes diabéticos com mau controle glicêmico, que desenvolvem DAP associada, levando a diminuição da nutrição cutânea, relacionada aos problemas cicatriciais do próprio diabetes, que culminam com ulcerações nos pés que podem progredir para necrose tissular e amputações.

Os resultados obtidos com o tratamento com o laser de baixa intensidade no estudo não foi o esperado quanto a uma das doses utilizadas, já que ele é uma terapia realizada para acelerar a cicatrização de ferimentos cutâneos em condições de normalidade vascular (como em traumas e queimaduras). Foram utilizadas 2 doses diferentes no protocolo de intervenção com os grupos experimentais. Os achados do estudo mostram que o modelo de associação DAP DM que foi submetido ao laser de 12 joules demorou mais para atingir 50% de cicatrização da ferida quando comparamos ao grupo que não foi submetido ao laser 12 joules. O mesmo não ocorreu com a dose de 6 joules, onde o grupo DAP DM L6 atingiu mais rapidamente 25% e 50% da cicatrização do que o grupo que foi submetido ao laser 12 joules. Houve inclusive aceleração da cicatrização tecidual quando comparado ao grupo DAP DM que foi tratado com laser, demonstrando o efeito benéfico desta dose no processo cicatricial.

Existem vários estudos envolvendo o uso do Laser de Baixa Intensidade para avaliar a cicatrização de ferimentos cutâneos. Porém há muita variação em relação aos parâmetros utilizados, sendo que não há um consenso, por exemplo, em relação à dosimetria do Laser. Uma revisão sistemática publicada recentemente (KWAN et

al., 2019) buscou avaliar a eficácia de vários recursos terapêuticos utilizados na cicatrização de feridas diabéticas e concluíram que apesar de não haver homogeneidade nos grupos analisados e muitas diferenças nos parâmetros de Laser usados nos estudos, o Laser de Baixa Intensidade demonstrou ser um recurso benéfico e biomodulador para o tratamento das feridas diabéticas. Além de influenciar no processo de cicatrização e na produção de colágeno, houve aumento na migração celular, fatores de crescimento e expressão gênica. Esses parâmetros incluem comprimento de onda, tipos de modelos de animais, potência, tempo de aplicação e densidade.

Assim, podemos observar no presente estudo que o uso de LBI para cicatrização de feridas em tecido com comprometimento metabólico e vascular é dose dependente, sendo que dose menor (6J) foi capaz de acelerar o processo cicatricial enquanto dose maior (12J) causou retardo no processo cicatricial. Pode-se especular que isso se deve ao mecanismo de ação do Laser, uma vez que este recurso aumenta o metabolismo tecidual (JUNIOR et al., 2007; O'BRIEN, 1998) e portanto, necessita de um aporte nutricional e circulatório adequado para que o processo cicatricial se acelere. Em feridas com as características do presente estudo, a menor dose foi capaz de acelerar este processo enquanto dose maior, provavelmente excedeu a capacidade metabólica tecidual ou de trocas microcirculatórias (devido ao déficit de aporte sanguíneo) desacoplando o sinal de promoção de crescimento tecidual com a capacidade de prover energia e substrato para tal.

A implicação clínica ainda deve ser investigada em outros estudos, mas os achados do presente, indicam que a dosimetria para estímulo de cicatrização tecidual deve ser baixa nas condições clínicas aqui mimetizadas e doses maiores de energia, que eventualmente são utilizadas para estímulo cicatricial em condições clínicas onde não há déficit metabólico ou de aporte sanguíneo, não são recomendadas para portadores de DM e DAP.

A ação benéfica do laser parece ser maior em comprimentos de onda intermediários (SUZUKI; TAKAKUDA, 2016), entre 600 e 860nm. No nosso estudo foi usado o comprimento de onda em 660nm. Em relação aos demais parâmetros ainda não existe uma padronização, por exemplo, de potências que variam entre 2 a

500mW e densidade de energia que pode variar entre 1 a 60J/cm². No presente estudo foi utilizado o comprimento de onda de 660nm e o tempo de aplicação do Laser foi o mesmo para as 2 doses. Um dos parâmetros que foi alterado foi a potência. Para a dose de 12 J foi usado 100mW e para a de 6 J foi usado 30mW. O fato da dose de 6 J ter cicatrizado as feridas mais rapidamente no início do tratamento pode ser explicada pela menor potência que foi utilizada para o grupo de animais avaliado. Em um estudo que analisou lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina, de ferimentos de ratos irradiados com laser de baixa intensidade, o LBI apresentou resultados positivos utilizando comprimento de onda de 670 nm e potência de 25 mW (DO NASCIMENTO et al., 2004).

Com relação à análise do tecido conjuntivo, o nosso estudo não encontrou diferenças significativas entre os grupos e as quantidades de fibras de colágenos analisadas no estudo. O laser de baixa intensidade, além de acelerar o processo de cicatrização em feridas diabéticas, influenciou a porcentagem de colágeno aumentando a quantidade de fibras de colágeno em um estudo onde foi usado comprimento de onda de 632.8 nm, potência de 5 mW e dose de 4 J/cm² (CARVALHO et al., 2006).

Embora não tenha sido estatisticamente diferente, o grupo DAP DM 6J tendeu a apresentar menor expressão de colágeno III, talvez demonstrando uma progressão maior para o remodelamento tardio da ferida comparado aos outros grupos. Isto pode estar relacionado com a maior expressão tardia de pro-MMP2 tecidual neste grupo. A pró-enzima (uma forma inativa da MMP) apresenta atividade catalítica no gel devido ao processo de renaturação proteica que acontece após a retirada do SDS, permitindo que o sítio ativo da pró-enzima fique exposto ao se renaturar, promovendo o contato com o substrato e sua consequente degeneração (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012). Isso permite uma análise da atividade total da pró-enzima e de sua isoforma ativa. Contudo, não foi encontrada diferença estatística na expressão de MMP2 na forma ativa.

Em um estudo investigando ferimentos com ratos diabéticos, foi observado uma diminuição da expressão de MMP-2 quando os ratos eram tratados com laser de baixa intensidade (dosimetria: 660nm, 50mW, 4J/cm², 80s) comparado com os ratos diabéticos não-tratados, sendo que o laser foi aplicado somente um dia (SILVA

et al., 2013b). Assim, pode ser que haja essa variação de expressão e atividade de MMP na ferida, no entanto, o design do nosso estudo não permitiu esta avaliação, uma vez que foi apenas quantificada a atividade de MMP ao final do período experimental.

O papel específico da MMP-2 na cicatrização de feridas ainda não está bem claro (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013), mas vem sendo observado que essa enzima participa de um processo de transição da matriz extracelular (MURPHY; NAGASE, 2008). Já a expressão de MMP 9 está mais diretamente relacionada à destruição da arquitetura normal da matriz. A quantificação de MMP 9 é possível pela técnica de zimografia e estamos adequando as condições de incubação para otimizar esta quantificação nas amostras do estudo.

Diante desses achados, fica claro que são necessários estudos adicionais com análise seriada de biópsias do tecido durante as fases de cicatrização, para esclarecimentos dos mecanismos celulares que determinam o efeito do LBI em baixa energia irradiada na aceleração de cicatrização de ferida cutâneas no modelo animais com DAP DM. Futuros estudos poderiam também investigar a densidade capilar tecidual e a prevenção de efeitos teciduais da hiperglicemia, como o estresse oxidativo.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que o modelo proposto se mostrou eficaz na geração de déficit circulatório e impactou a cicatrização de feridas cutâneas na pata ipsilateral e que a combinação de DAP e DM causa um maior déficit cicatricial.

Existe efeito dose-dependente do laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas cutâneas em animais com déficit metabólico e vascular. O Laser na dose de 12J não foi capaz de acelerar a cicatrização em modelos de animais com DAP, DM ou as duas condições associadas, contudo, na dose de 6J o laser acelerou o processo cicatricial em animais com DAP e DM associados.

REFERÊNCIAS

AMBROSE, J.A.; BARUA, R.S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 10, p. 1731-7, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. suppl1, p. S13-S27, 2018.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). **Circulation**, 2005.

ANSELL, D. M.; HOLDEN, K. A.; HARDMAN, J. Animal models of wound repair: Are they cutting it? **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 581-85, 2012.

AZUMA, N. The Diagnostic Classification of Critical Limb Ischemia. **Annals of Vascular Disease**, v. 11, n. 14, p. 187-195, 2018.

BENDICK, P. J. et al. Progression of atherosclerosis in diabetics. **Surgery**, v. 93, n. 6, p. 834-838, 1983.

BENJAMIN, M. M.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. **EXS**, v. 103, p. 209–79, 2012.

BLACK M.J., et al. Chronic type 1 diabetes in spontaneously hypertensive rats leads to exacerbated cardiac fibrosis. **Cardiovasc. Pathol**, v. 19, p. 361-370, 2010.

BOULTON, A. J. M.; et al. Comprehensive foot examination and risk assessment: a report of the task force of the foot care interest group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. **Diabetes Care**, v. 31, n. 8, p. 1679-1685, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

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

CADE, W. T. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. **Phys. Ther**, v. 88, n. 11, p. 1322-35, 2008.

CARDINAL, J.W. et al. Differential metabolic accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced β cell death in inbred mice. **Endocrinology**, v. 139, p. 2885-2889, 1998.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 177-183, 2006.

CRIQUI, M. H.; ABOYANS, V. Epidemiology of Peripheral Artery Disease. **Circulation Research**, v. 116, p. 1509-1526, 2015.

DELUCCIA, N. Doença vascular e diabetes. **J Vasc Br**, v. 2, n. 1, p. 49-60, 2003.

DE OLIVEIRA, R. F.; DA SILVA, A. C.; et al. Laser Therapy in the Treatment of Paresthesia: A Retrospective Study of 125 clinical cases. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 8, p. 415-23, 2015.

DOGAN, E.; YANMAZ, L.; GEDCKLI, S.; ERSOZ, U.; OKUMUS, Z. The effect of Pycnogenol on wound healing in Diabetic Rats. **Ostomy Wound Manage**, v. 63, n. 4, p. 41-47, 2017.

DO NASCIMENTO, P. M. et al. A Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 6, p. 513–518, dez. 2004.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: A review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 6, p. 591–599, 2004.

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

FLETCHER, L. Management of patients with intermittent claudication. **Nursing Standard**, v. 20, n. 31, p. 59-65, 2006.

GREY, J. E.; ENOCH, S.; HARDING, K. G. ABC of wound healing. Venous and arterial leg ulcers. **British Medical Journal**. v. 332, p. 346-50, 2006.

GULCAN, E. et al. Topical effects of nebivolol on wounds in diabetic rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 451-455, 2012.

HEDAYATI, N.; CARSON, J. G.; CHI, Y.W.; LINK, D. Management of mixed arterial venous lower extremity ulceration: A review. **Vascular Medicine**, v. 20, n. 5, p. 479-486, 2015.

HIRSCH, A. T.; et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (Lower extremity, Renal, Mesenteric and Abdominal Aortic. Executive Summary a Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology. Society of Interventional Radiology and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation: National Heart, Lung and blood Institute; Society for Vascular Nursing; Transatlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, n. 6, p. 1239-1312, 2006.

HIATT, W.R. Medical Treatment of Peripheral Arterial Disease and Claudication. **N Engl J Med**, v. 344, n. 21, p. 1608-1621, 2001.

HISS, J. et al. Aging of wound healing in an experimental model in mice. **The**

American journal of forensic medicine and pathology, v. 9, n. 4, p. 310–2, 1988.

JOHNSTON, K. W et al. An Atherosclerosis risk factor assessment program for patients with peripheral arterial occlusive disease. **Annals of Vascular Surgery**, v. 2, n. 2, p. 101-107, 1988.

JUNIOR, A. M. R., et al. 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, n. 3, p. 258-266, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**, v. 74, p. 153–156, 1982.

KAJAGAR, B. M; et al. Efficacy of Low-Level therapy on wound healing in Patients with Chronic Diabetic Foot Ulcers – a Randomised Control Trial. **Indian J Surg**, v. 74, n. 5, p. 359-363, 2012.

KORELO, R. I. G. et al. Wound healing treatment by high frequency ultrasound, microcurrent, and combined therapy modifies the immune response in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 20, n. 2, p. 133–141, 2016.

KWAN, R. L.; LU, S.; et al. Efficacy of Biophysical energies on healing of diabetic skin wounds in cell studies and animal experimental models: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-38, 2019.

LA ROCCA, G. et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British journal of cancer**, v. 90, n. 7, p. 1414–21, 2004.

LEVY, P. J. Epidemiology and pathophysiology of peripheral arterial disease. **Clinical Cornestone Peripheral Arterial Disease**, vol.4, n. 5, p. 1-13, 2002.

LIM, C. S.; SHALHOUB, J.; GOHEL, M. S.; et al. Matriz Metalloproteinases in Vascular Disease – A Potential Therapeutic Target? **Current Vascular Pharmacology**, v. 8, p. 75-85, 2010.

MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell and Tissue Research**, v. 351, n. 2, p. 255–268, 18 fev. 2013.

MAURI, G., et al. Percutaneous laser ablation for benign and malignant thyroid diseases. **Ultrasonography**, v. 38, n. 1, p. 25-36, 2019.

MCDANIEL, M. D.; CRONENWETT, J. L. Basic data related to the natural history of intermittent claudication. **Ann. Vasc Surg**, v. 3, n. 3, p. 273-277, 1989.

MASCARENHAS, J. V.; ALBAYATI, M. A.; SHEARMAN, C. P.; JUDE, E.B. Peripheral Arterial Disease. **Endocrinol Metab Clin A Am**, v. 43, p. 149-166, 2014.

MAKDISSE, M. et al. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the hearts of Brazil project. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 6, p. 402-414, 2008.

MEYER, F. J. et al. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. **The British journal of surgery**, v. 95, n. 3, p. 319-25, 2008.

MILKIEWICZ, M.; HUDLICKA, O.; SHINER, R.; EGGINTON, S.; BROWN, M. D. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. **J Physiol**, v. 577, p. 671-78, 2006.

MUIR, R. L. Peripheral arterial disease: pathophysiology, risk factors, diagnosis, treatment, and prevention. **Journal of Vascular Nursing**, v. 27, n. 2, p. 26-30, 2009.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, 2008.

NAGASAO, J.; YOSHIOKA, K.; AMASAKI, H.; TSUJIO, M.; OGAWA, M.; TANIGUCHI, I. K.; MUTOH, K. Morphological changes in the rat endocrine pancreas within 12 h of intravenous streptozotocin administration. **Anat Hist Embryol**, v. 34, p. 42-7, 2005.

NORGREN, L.; HIATT, W. R.; DORMANDY, J. A.; et al. Inter-Society Consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). **International Angiology**, v. 26, n. 2, p. 82-157, 2007.

NUNAN, R.; HARDING, K. G.; MARTIN, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. **Disease models & mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1205–13, 2014.

O'BRIEN, T. P.; LI, Q.; ASHRAF, M. F.; MATTESON, D. M.; et al. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. **Arch Ophthalmol**, v. 116, p. 1470-1474, 1998.

PIPINOS, I. I., et al. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, n. 1, p. 290-6, 2008.

RIDKER, P. M.; et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk developing peripheral vascular disease. **Circulation**, v. 97, p. 425-28, 1998.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and Picrosirius Red Staining: A Polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz J Morphol Sci**, v. 22, n. 2, p. 97–104, 2005.

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Curr Probl Surg Chicago**, v. 38, n. 2, p. 73-94, 2001.

ROSENBAUM, M. A.; MIYAZAKI, K.; GRAHAM, M. Hypercholesterolemia Inhibits Endothelial Cell Healing After Arterial Injury Through Reactive Oxygen Species. **J Vasc Surg.**, v. 55, n. 2, p. 489-496, 2012.

ROOKE, T. W.; HIRSCH, A. T., MISRA, S. 2011 ACCF/AHA Focused update of the guideline for the management of peripheral arterial disease. **J Vasc Surg**, v. 54, n. 5, p. e32-e58, 2011.

SALES, A. T.; RIBEIRO, C. D.; DIAS, F. L. Lower extremity peripheral artery disease: Implications for Physiotherapy. **Jour Resp Cardio Phys Ther**, v. 1, n. 1, p. 23-33, 2012.

SELVIN, E.; MARINOPOULOUS, S.; BERKENBLIT, G.; et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, v. 141, p. 421-431, 2004.

SHARPE, J. R.; MARTIN, Y. Strategies Demonstrating Efficacy in Reducing Wound Contraction In Vivo. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 4, p. 167-175, 2013.

SILVA, A. A. D. A.; et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **Journal of cosmetic and laser therapy: official publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 210-6, 2013.

SILVA, A. A. DA et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet.Laser Ther.**, v. 15, n. 1476-4180 (Electronic), p. 210-216, ago. 2013b.

SILVA, F. S. D. A.; et al. Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 229-234, 2014.

SILVA, F. S.; et al. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 29, p. 37-44, 2017.

SILVEIRA, P. C. L.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 279-282, 2007.

SIGVANT, B.; LUNDIN, F.; WAHLBERG, E. The Risk of Disease Progression in Peripheral Arterial Disease is Higher than Expected: A Meta-Analysis of Mortality and Disease Progression in Peripheral Arterial Disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 51, p. 395-403, 2015

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, 2015.

STAFFORD, R. J. et al. Laser-induced thermal therapy for tumor ablation. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 38, n. 1, p. 79-100, 2010.

SUZUKI, R.; TAKAKUDA, K. Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 8, p. 1683-1689, 5

nov. 2016.

TAJHYA, R. B.; PATEL, R. S.; BEETON, C. Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. **Methods in molecular biology**, v. 1579, p. 231–244, 2017.

TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. **Methods in molecular biology**, v. 57, p. 163-174, 2001.

TUK, B. et al. Hyperbaric oxygen therapy to treat diabetes impaired wound healing in rats. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108533 1-8, 2014.

VAGHARDOOST, R., et al. Effect of low-level Laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery: a randomized controlled trial. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 3, p. 603-07, 2018.

WATANABE, A.; POOLE, D. C.; KANO, Y. The effects of RSR13 on microvascular PO₂ kinetics and muscle contractile performance in the rat arterial ligation model of peripheral arterial disease. **J Appl Physiol**, v. 123, p. 764–772, 2017.

WATSON, K.; WATSON, B. D.; PATER, K. S. Peripheral arterial disease: a review of disease awareness and management. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v. 4, n. 4, p. 365-379, 2006.

WYSOCKI, A. B.; STAIANO-COICO, L.; GRINNELL, F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. **The Journal of investigative dermatology**, v. 101, n.1, p. 64-8, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. Part 2: Preventing Diabetes, 2016.

YOSHIDA, W. B. Angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis: treatment of the future for lower limb critical ischemia? **J Vasc Bras**, v. 4, n. 4, p. 316-318, 2005.

XU, H.; LU, S.; DING, L.; LYU, L.; et al. Pulsatility Index as a Novel Parameter for Perfusion in Mouse Model of Hindlimb Ischemia. **Cell Physiol Biochem**, v. 48, p. 2114-2122, 2018.

ANEXO A- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 953

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.121604/2016-96

APROVADO/APPROVAL: 12/04/2016 – R.O. 03/2016

TÍTULO: Efeitos da Laserterapia na Cicatrização de Úlceras em Ratos com Insuficiência Arterial e Diabetes Melito.

TITLE: Effects of Laser therapy on healing of ulcers in rats with Arterial Insufficiency and Diabetes Mellitus.

AUTORES/AUTHORS: Rosalvo Tadeu Hochmuller fogaça, Cibele Teresinha Dias Ribeiro, Diego Neves Araújo, Fernando Augusto Lavezzo dias.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia


Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA

ANEXO B- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UIC

UIC UNIVERSITY OF ILLINOIS
AT CHICAGO

Office of Animal Care and
Institutional Biosafety Committees (MC 672)
Office of the Vice Chancellor for Research
206 Administrative Office Building
1737 West Polk Street
Chicago, Illinois 60612-7227

July 13, 2017

Beata M. Wolska
Medicine/Cardiology
M/C 715

Dear Dr. Wolska:

The protocol indicated below was reviewed at a convened ACC meeting in accordance with the Animal Care Policies of the University of Illinois at Chicago on **6/20/2017**. *The protocol was not initiated until final clarifications were reviewed and approved on 7/12/2017. The protocol is approved for a period of 3 years with annual continuation.*

Title of Application: Arterial and Venous Insufficiency in Lower Limb of Rats

ACC Number: 17-101

Initial Approval Period: 7/12/2017 to 6/20/2018

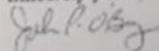
Current Funding: *Currently protocol NOT matched to specific funding source. Modification will need to be submitted prior to Just in time or acceptance of award to match protocol to external funding source. All animal work proposed in the funding application must be covered by an approved protocol.*

UIC is the only performance site currently approved for this protocol.

This institution has Animal Welfare Assurance Number A3460.01 on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), NIH. **This letter may only be provided as proof of IACUC approval for those specific funding sources listed above in which all portions of the funding proposal are matched to this ACC protocol.**

In addition, all investigators are responsible for ensuring compliance with all federal and institutional policies and regulations related to use of animals under this protocol and the funding sources listed on this protocol. Please use OLAW's "What Investigators Need to Know about the Use of Animals" (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/InvestigatorsNeed2Know.pdf>) as a reference guide. Thank you for complying with the Animal Care Policies and Procedures of UIC.

Sincerely yours,



John P. O'Bryan, PhD
Chair, Animal Care Committee

JPO/ss

cc: BRL, ACC File, Shamim Chowdhury, Diego Neves Araujo