

Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual - um estudo comparativo

Quantitative and semiquantitative analysis of collagen in wound healing - a comparative study

Sarah Souza Lima¹, Beatriz Paim de Figueiredo Braitenbach², Flávia Quadros Lima³, Antônio Márcio Teixeira Marchionni⁴, Carlos Maurício Cardeal Mendes⁵, Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado^{6*}

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ² Acadêmica do Curso de Nutrição da Universidade Federal da Bahia; ³ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; ⁴ Doutor em Laser, Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; ⁵ Doutor em Saúde Coletiva, Professor do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ⁶ Doutora em Patologia Humana, Professora Associada do Instituto de Ciências da Saúde e do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia

Resumo

Introdução: diversos estudos têm destacado a relevância do colágeno no contexto do reparo tecidual, em especial, sob influência de diferentes terapias biomoduladoras. A análise do colágeno tem sido realizada mediante diferentes abordagens metodológicas, entre as quais se destacam as análises semiquantitativa e histomorfométrica. **Objetivos:** O presente estudo objetivou comparar os Resultados de dois tipos de análise acerca da presença de fibras colágenas na matriz extracelular durante a cicatrização cutânea, em ferimentos fotobiomodulados. **Metodologia:** vinte ratos machos Wistar, foram submetidos à indução de uma ferida cutânea padronizada dorsal e divididos em dois grupos, Controle (GC) e Fotobiomodulado com laser (GL). Os períodos de morte corresponderam ao 5º. e 10º. dias. As seções histológicas foram coradas com Sírius vermelho para análise semiquantitativa e histomorfométrica do colágeno. **Resultados:** dois parâmetros foram utilizados para comparar o desfecho primário, um critério de grandeza quantitativa em porcentagem (área de colágeno), e o segundo critério semiquantitativo, com grandezas conferidas de acordo com escores que variaram de leve a intenso. Não foram observados Resultados divergentes entre os dois tipos de análise. No 5º. dia, independente do tipo de análise, constatou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o submetido à Fotobiomodulação ($p < 0,05$), embora tal efeito tenha sido considerado pequeno. **Conclusão:** estes dados sugerem que ambos os métodos de análise foram capazes de reproduzir Resultados semelhantes, cabendo ao pesquisador eleger aquele que melhor se adequa ao escopo de sua pesquisa.

Palavras-chave: Colágeno. Cicatrização. Laser Terapia

Abstract

Introduction: several studies highlighted the relevance of collagen in the context of wound healing, especially under the influence of different biomodulatory therapies. Collagen analysis has been performed using different methodological approaches, among which semi-quantitative and histomorphometric analyzes stand out. The present study aimed to compare the Results of two methods of analysis regarding the presence of collagen fibers in the extracellular matrix during wound healing, in photobiomodulated wounds. **Methods:** twenty male Wistar rats were submitted to the induction of a standardized dorsal skin wound and divided into two groups, Control (GC) and Laser Photobiomodulated (GL). The periods of death corresponded to the 5th. and 10th. days. Histological sections were stained with Sirius red for semiquantitative and histomorphometric analysis of collagen. **Results:** two parameters were used to compare the primary outcome, a quantitative magnitude criterion in percentage (collagen area), and the second semiquantitative criterion, with magnitudes conferred according to scores that varied from mild to severe. No divergent Results were observed between the two types of analysis. On the 5th. day, regardless of the type of analysis, there was a statistically significant difference between the control group and the group submitted to Photobiomodulation ($p < 0.05$), although this effect was considered small. **Conclusion:** these data suggest that both analysis methods were able to reproduce similar Results, leaving the researcher to choose the one that best fits the scope of his research.

Keywords: Collagen. Wound Healing. Laser Therapy

INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e também é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Já foram identificados vinte e nove tipos de colágeno, sendo que todos apresentam

Correspondente/Corresponding: *Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado – End: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar. Programa de Pós-Graduação dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. – Tel: (+55) (71) 3257-8200 – E-mail: armedrado@ufba.br

uma estrutura terciária tripla-helicoidal, e, na maioria dos tecidos conjuntivos, se constituem parte integrante da rede de fibrilas organizadas espacialmente no interior da matriz extracelular (MEC), que resulta em uma estrutura tridimensional altamente especializada¹. O colágeno é formado por cadeias polipeptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, organizadas paralelamente em alfa-hélice, estabilizadas por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares. A proteína apresenta em média 280 nm de comprimento e massa molecular de 300.000 Da².

No contexto do reparo tecidual, o colágeno é sintetizado por fibroblastos e sofre modificações ao longo do seu processo de biossíntese, a exemplo de reações de hidroxilação e glicosilação. A sua caracterização bioquímica, quantidade e padrão organizacional variam e determinam a resistência da cicatriz fibrosa final³. O colágeno é um componente estrutural importante nas diferentes fases do reparo tecidual. Na fase de hemostasia, a exposição do colágeno subendotelial resulta na ativação e agregação plaquetária, com consequente formação de coágulo constituído por uma rede de fibrina, no local da lesão. Já na fase inflamatória inicial, começa a ocorrer nova biossíntese de colágeno do tipo III, com arranjo mais delicado de fibrilas delgadas. Este é o tipo de colágeno predominante e se constitui o substrato para migração de células do sistema imune, com o propósito de conduzir, mediante cascatas de sinalização induzidas por citocinas pró-inflamatórias, a quimiotaxia de leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Durante a fase proliferativa, os fibroblastos, por sua vez, aumentam em número e intensificam o processo de biossíntese de colágeno tipo I e metaloproteinases da matriz (MMPs). Há crescente excitose de fatores de crescimento, que conduzem à angiogênese e à re-epitelização. Na fase mais avançada do reparo correspondente ao remodelamento, ocorre concomitante biossíntese e degradação das fibras colágenas e um aumento da resistência tênsil no leito da lesão em cicatrização⁴.

Diante da importância do colágeno na cicatrização e em muitos outros contextos, o estudo dessa proteína da matriz extracelular sob influência de diferentes terapias biomoduladoras como a ozonioterapia, a fotobiomodulação, o uso de fitoterápicos, entre outras, tem sido realizado por meio de diversas abordagens metodológicas. Um exemplo neste sentido, foi o estudo desenvolvido por Pires et al.⁵ (2021), no qual os autores demonstraram que o gás ozônio foi capaz de induzir maior biossíntese de colágeno em comparação ao grupo controle, através de análise quantitativa. Tal estudo, também evidenciou que o grupo biomodulado pelo ozônio, apresentou uma média significativamente maior de contração do tecido. Adicionalmente, Cunha et al.⁶ (2019), utilizaram a fotobiomodulação laser como terapia biomoduladora no reparo tecidual cutâneo de ratos e descreveram resultados semelhantes também mediante análise quantitativa. Contudo, outros métodos de análise do colágeno tem

sido descritos na literatura, geralmente em modelos experimentais relacionados ao reparo de variados tipos de tecido. Alvarenga et al.⁷ (2020), avaliaram o padrão organizacional das fibras colágenas em língua de ratos através de uma análise semiquantitativa. Os autores demonstraram que as lesões tratadas com óleo de copaíba apresentaram maior redução da ferida, menor grau de inflamação, e maior grau de re-epitelização. O grupo tratado com copaíba apresentou melhor padrão de organização de fibras colágenas em relação ao grupo controle. Adicionalmente, em um outro estudo, foi realizada análise histomorfométrica por meio da técnica de microscopia com luz polarizada para determinar o quantitativo de fibras colágenas na matriz extracelular⁸.

Em relação à fotobiomodulação laser (FL) ou terapia com laser de baixa intensidade (LLLT), esta surgiu como uma abordagem terapêutica de natureza biofísica, não invasiva e indolor, promissora para promover a aceleração da cicatrização de feridas através da redução da inflamação e dor⁹. Desde a sua utilização inicial há mais de 50 anos, tem aumentado o número de evidências científicas acerca do seu potencial de ação nas diferentes fases do reparo tecidual. Em estudo experimental, desenvolvido em 2008, Medrado et al.¹⁰, demonstraram que a utilização da fotobiomodulação laser foi responsável pela regressão do edema e diminuição do número de células inflamatórias no leito de ferimentos cutâneos padronizados em ratos Wistar. Ademais, tais autores relataram que no grupo de animais irradiados com laser de arseneto de gálio e alumínio de 607 nm, com dosimetria de 4 J/cm² por dia de aplicação, a realização de uma análise semiquantitativa do colágeno permitiu inferir que houve melhor padrão organizacional e compactação dos feixes de fibras colágenas recém-formadas, com diferenças estatisticamente significativas nos animais tratados com fotobiomodulação. Contudo, em outros estudos, tem crescido a opção pela análise do colágeno através de métodos mais objetivos, a exemplo da histomorfometria já citada¹¹.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou analisar comparativamente dois métodos de análise de fibras colágenas que compreenderam respectivamente análise semiquantitativa e morfometria com aferição da área do colágeno em um modelo experimental de cicatrização cutânea *in vivo*, sob a ação da fotobiomodulação laser.

METODOLOGIA

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com peso entre 150-300g do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Estes foram aleatoriamente divididos, através de sorteio, em 2 grupos de 10 ratos cada, os quais foram mortos 5 e 10 dias após os tratamentos propostos. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e não recebeu nenhum tratamento, exceto o contato com a ponta ativa do laser desligado; O Grupo 2, denominado de Grupo Laser (GL) foi submetido à fotobiomodulação laser convencional por contato e emissão de luz.

Considerando que o desfecho primário do estudo fosse representado pela área do colágeno e que a menor diferença entre os grupos considerasse no grupo controle uma área aproximada de 10 μ m por campo e no grupo de animais submetidos à fotobiomodulação laser, 13 μ m por campo, com desvio padrão de 5, alfa de 5% e poder do estudo de 80%, estimou-se para a amostra 10 animais por grupo (WINPEPI (PEPI-for-Windows).

Durante o experimento, os animais foram mantidos na Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em condições sanitárias de biotério convencional desta Instituição. O acondicionamento dos animais foi realizado em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto por maravalha. Os ratos foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz-escuro por 12 horas, e expostos à luminosidade artificial doze horas por dia. A alimentação dos ratos foi feita com ração balanceada Nuvilah® (Suprilab) e água *ad libitum*. Foram adotados cuidados específicos com relação à limpeza e o ambiente protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse.

Os animais foram submetidos à pesagem, anestesiados com Cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com as dosagens de 2mg/kg e 3mg/kg respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal e antisepsia com Iodopovidine (Rioquímica, São Paulo, Brasil). Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, também denominado de *punch*, (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com 6mm de diâmetro para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, executada por um único operador devidamente calibrado.

Os ferimentos cutâneos dos ratos do Grupo Laser (GL) foram submetidos a 4 aplicações pontuais de 1 J/cm², com dosimetria total de 4 J/cm², por dia de aplicação. Utilizou-se um aparelho semiconductor de laser de arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa, 9 mW, 670 nm, Laser de diodo de 0,031 W/cm²), com emissão contínua e área da ponta ativa de 0,28 cm² (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil). A dosimetria final foi de 12 J/cm² pois os ratos foram irradiados em 3 dias consecutivos após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram submetidos à terapia biomoduladora descrita nos dias 1, 2 e 3 do estudo. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento com o aparelho desligado. Cada grupo com 10 animais teve metade dos espécimes sacrificados no 5º dia e a outra metade no 10º dia. Após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram alocados em grupos na câmara de gás onde foi liberado gás carbônico em uma concentração de 5 litros por minuto.

Após a confirmação de morte, foi removida uma porção de tecido do dorso dos ratos que compreendia a ferida cirúrgica. O espécime foi fixado por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponado. Os fragmentos de pele contendo a lesão foram submetidos a cortes histológicos de 4 micrômetros de

espessura e corados com Sírius vermelho a fim de analisar a neocolagênese.

A captura das imagens das secções teciduais submetidas à coloração descrita foi realizada através do *software Motic Images Advanced 3.0*® (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 13107,200000 pixels. Cinco áreas padrão nos mesmos moldes já descritos foram obtidas para análise da neocolagênese em secções coradas com Sírius vermelho. Essas áreas foram documentadas nas regiões correspondentes aos bordos da úlcera, uma fotomicrografia de cada lado, e três áreas foram obtidas a partir da região central da derme subjacente à localização da úlcera cutânea. Cada fotomicrografia foi obtida com o aumento de 40x e salva em formato JPEG para realização da mensuração da área total do colágeno em μ m². Foi calculada uma média aritmética em micrômetros, de acordo com o estudo de Miot, Brianezi¹² (2010).

A presença do colágeno na derme foi também avaliada através de análise semiquantitativa de acordo com os critérios por Alvarenga et al.⁷ (2020). As fibras colágenas foram classificadas através de três escores: 1. fibras colágenas finas, delicadas, frouxamente organizadas vistas em toda a área da ferida; 2. fibras colágenas finas, delicadas frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas e grossas em outras áreas da ferida e 3. fibras colágenas espessas, grossas e densamente organizadas vistas em toda a área da ferida.

Foram obtidas as estatísticas descritivas: proporção para a variável escala e mediana mais percentis 25 e 75 para a variável área de acordo com os grupos independentes de intervenção, 2 a 2.

Para se verificar a associação entre os grupos de intervenção e a escala utilizou-se a medida de associação do tipo *d*, delta de Somers, devido à natureza qualitativa ordinal da variável escala, juntamente com o valor de *p* oriundo do teste exato de Fisher. Para se verificar o grau de associação entre os grupos de intervenção e a variável dependente área realizou-se a medida de associação do tipo *d* construída a partir da estatística U de Mann-Whitney¹³, assim como calculou-se o valor de *p* a partir do teste de Mann-Whitney, 2 a 2, para grupos independentes.

O critério adotado para a verificação da força de associação para as medidas tipo *d* baseou-se em pontos de corte genéricos usados internacionalmente: [0-0,41]: ausente; [0,41-1,15]: pequena; [1,15-2,70]: moderada; > 2,70: grande¹⁴.

Os dados foram analisados no pacote estatístico R¹⁵.

RESULTADOS

No período de 5 dias, a análise semiquantitativa das secções teciduais coradas com Sírius vermelho, revelou no GC, um padrão de desorganização de fibras colágenas recém-formadas nas áreas correspondentes aos bordos

do ferimento cutâneo padronizado, logo abaixo do tecido epitelial em formação, enquanto que no grupo submetido à fotobiomodulação, as fibras de colágeno se apresentavam de forma organizada, mais espessas e grossas em algumas áreas do ferimento ($p=0,047$); (Tabela 1). A tabela 2 ilustra os valores da análise quantitativa da área do colágeno em cada secção histológica. Foi observada diferença estatisticamente significativa também no período de 5 dias ($p=0,15$). O efeito da Fotobiomodulação entre os grupos Controle e Laser (0,83) foi considerado “pequeno” (Tabela 3).

No décimo dia, a análise semiquantitativa evidenciou, tanto no GC quanto no GL, fibras colágenas mais finas e frouxamente organizadas em algumas áreas, e em outras, fibras mais espessas e organizadas ($p=1,0$); (Tabela 1). A análise quantitativa da área das fibras colágenas, neste período demonstrou ser maior no GL, embora não tenha sido estatisticamente significativa ($p=1,0$); (Tabela 2). O efeito da Fotobiomodulação entre GC e GL (0,03), neste período, foi considerado “ausente” (Tabela 3).

Tabela 1 - Medianas e intervalos interquartílicos calculados a partir da análise semiquantitativa, em função do grupo experimental e tempo de análise.

Grupo	Tempo (dias)	
	5	10
	Mediana (Quartis)	Mediana (Quartis)
GC	1 (1 - 1)	2 (2 - 3)
GL	2 (1 - 2)*	2 (2 - 2)

* $p<0,05$.

Fonte: autoria própria

Tabela 2 – Medianas e intervalos interquartílicos calculados a partir da análise quantitativa, em função do grupo experimental e tempo de análise.

Grupo	Tempo (dias)	
	5	10
	Mediana (Quartis)	Mediana (Quartis)
GC	20,603 (16,988 - 23,159)	25,713 (20,750 - 27,628)
GL	23,460 (22,170 - 28,286)*	30,135(20,520 - 32,004)

* $p<0,05$.

Fonte: autoria própria

Tabela 3 - Tamanho dos efeitos de acordo com as análises realizadas, em função do grupo experimental e tempo de análise.

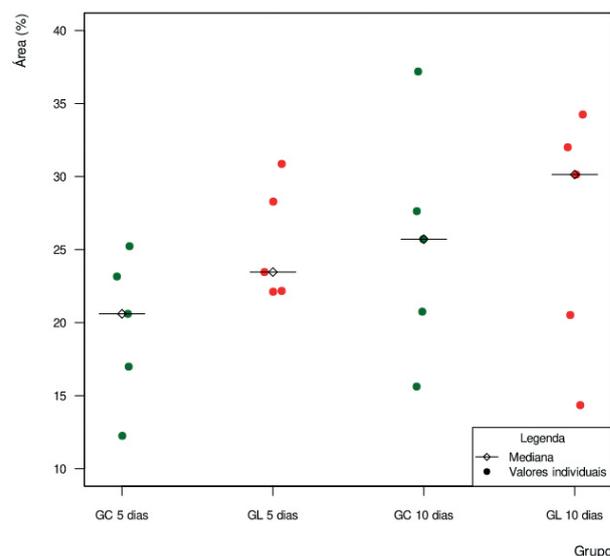
	Grupo/Tempo	Efeito	Qualificação do efeito	Valor de p
Análise semiquantitativa	GC5 X GL5	0,83	Efeito pequeno	0,047
	GC10 X GL10	0,56	Efeito pequeno	1
Análise quantitativa	GC5 X GL5	0,5	Efeito pequeno	0,150
	GC10 X GL10	0,03	Efeito ausente	1

Critério para tamanho do efeito - [0-0,41]: Ausente; [0,41-1,15]: Pequena; [1,15-2,70]: Moderada; > 2,70: Grande.

Fonte: autoria própria

A figura 1 ilustra os valores observados na análise quantitativa da área da ferida em medianas e quartis, em ambos os grupos experimentais nos dois períodos do estudo.

Figura 1 – Gráfico de dispersão das medianas das áreas de colágeno, dos grupos GC e GL nos tempos de 5 e 10 dias.



Fonte: autoria própria

DISCUSSÃO

Durante o reparo tecidual, a neocolagênese representa um evento crítico, pois determinará a força tênsil do novo tecido em formação¹⁶. Neste contexto, diferentes métodos de análise do colágeno têm sido propostos na literatura. De forma geral, as análises semiquantitativa e quantitativa representam os tipos mais usuais de métodos para o estudo do colágeno. Em estudo realizado por Cunha et al.⁶ (2019), sobre os efeitos de diferentes protocolos de laserterapia sob a biossíntese de colágeno em feridas, a análise quantitativa realizada demonstrou uma deposição de colágeno maior no grupo fotobiomodulado com laser (irradiado com 16 J/cm² diariamente) em comparação aos

grupos controle. Por outro lado, no estudo semiquantitativo realizado por Freitas et al.¹⁷ (2021), foram atribuídas categorias para avaliar a presença de fibras colágenas na matriz extracelular, as quais foram definidas como “leve” (escore 1), “moderada” (escore 2) e “intensa” (escore 3). Foi constatado que o grupo fotobiomodulado apresentou escores mais altos em relação ao grupo controle. Embora, tais estudos tenham utilizado diferentes abordagens metodológicas para avaliar o mesmo desfecho, os resultados foram semelhantes no tocante à superioridade dos efeitos descritos nos grupos tratados com Fotobiomodulação.

No presente estudo de caráter comparativo, observou-se que, independente do método de análise utilizado, a saber semiquantitativo ou histomorfométrico, os resultados encontrados em ambas as análises demonstraram similaridade, inclusive no que diz respeito à existência de diferença estatisticamente significativa, em especial, no 5º dia do período pós-operatório. A análise semiquantitativa apresentou escores superiores para o grupo laser em relação ao grupo controle e, em correspondência, a análise quantitativa demonstrou o mesmo resultado em mediana para área de colágeno, no mesmo período. Contudo, no 10º dia, ambas as análises não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais no tocante à presença de colágeno.

Nos últimos anos, tem sido observada uma tendência à realização de estudos que utilizaram análise quantitativa. De fato, há na literatura crescente valorização de estudos quantitativos que tem investigado diferentes variáveis do reparo tecidual, a exemplo da expressão de colágeno¹⁸. O presente estudo objetivou verificar a existência ou não de uma possível correspondência entre dois tipos diferentes de análise do colágeno em um modelo experimental clássico de cicatrização cutânea sob a influência da Fotobiomodulação. A realização de estudos de caráter experimental com o objetivo de analisar os efeitos teciduais induzidos pela Fotobiomodulação tem aumentado nos últimos anos¹⁷. De fato, diferentes variáveis do reparo tecidual, como intensidade da inflamação, densidade vascular, neocolagênese, e re-epitelização, entre outras, têm sido documentadas tanto através de análises quanti como semiquantitativas¹⁹.

Segundo Lopez, Brundage²⁰ (2019), os efeitos anti-inflamatórios e bioestimuladores da Fotobiomodulação podem ser atribuídos a uma reação fotoquímica na área da ferida. Os autores sugerem que o mecanismo principal seja representado pela absorção dos fótons emitidos pelo Laser por parte dos cromóforos presentes nas mitocôndrias das células que integram o microambiente da lesão, gerando um estímulo para síntese de adenosina trifosfato (ATP), bem como uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Em associação à redução da inflamação, a dor também seria atenuada. Embora não tenha sido objetivo do presente estudo analisar as variáveis da fase inflamatória do reparo sob a influência da fotobiomodulação, a sua realização ratificou os achados de outros autores publicados na literatura que demons-

traram aumento da expressão de colágeno na matriz extracelular relacionado ao uso da fotobiomodulação^{21,22}.

Urge destacar a existência de grande heterogeneidade nos parâmetros relatados nos estudos que avaliaram o potencial terapêutico da Fotobiomodulação, tais como o tipo do laser, a frequência de tratamento, a densidade de potência e de energia, assim como o tempo de aplicação²³. Quanto ao intervalo de tempo das análises da evolução do reparo, percebe-se similar heterogeneidade na literatura, haja vista a documentação de estudos que utilizaram diferentes períodos de análise, como 5, 10 e 15 dias Prabhu et al.²⁴ (2020), assim como intervalos de 7, 14 e 21 dias Cunha et al.⁶ (2019), e ainda tempos mais prolongados como os descritos por Medrado et al.¹⁰ (2008), como 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 dias. Tais estudos apontam para um comportamento semelhante de parâmetros de análise após o dia 7, tanto entre os grupos que receberam fotobiomodulação quanto os grupos controle, o que sugere uma atuação mais impactante da fotobiomodulação laser nas fases mais iniciais do processo de reparo. Achados semelhantes foram observados no presente estudo, pois a partir do 10º dia do período pós-operatório não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, independente do tipo de análise realizada.

Uma possível explicação para a constatação de diferenças estatisticamente significativas nos períodos iniciais pode ser atribuída ao potencial de oxidação-redução da Fotobiomodulação laser na fase inflamatória bem como na fase proliferativa, pois tal terapia pode estimular resolução mais rápida do edema e células inflamatórias, assim como estimular a proliferação celular através do aumento da produção de fatores de crescimento no leito do ferimento e dessa forma, acelerar o fechamento da ferida²⁰.

Cabe ressaltar que o presente estudo apresenta algumas limitações, pois os resultados do presente estudo demonstraram que apesar de existir diferença estatisticamente significativa quanto à variável colágeno entre os dois grupos experimentais, o seu efeito foi considerado pequeno ou ausente a depender do tipo de análise. Provavelmente, o pequeno número de animais e a proximidade dos períodos de sacrifício dos animais podem ter interferido nos resultados obtidos a partir da análise estatística realizada.

CONCLUSÃO

A presente investigação realizou um estudo comparativo entre dois métodos de avaliação da presença de fibras colágenas na matriz extracelular durante o reparo tecidual sob a influência da Fotobiomodulação laser, representados pelas análises semiquantitativa e histomorfométrica. Independente do tipo de análise realizada, os resultados foram semelhantes e evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo fotobiomodulado e o controle no 5º. dia do período pós-operatório. Estes dados sugerem que ambos os métodos de análise foram

capazes de reproduzir resultados semelhantes, cabendo ao pesquisador eleger aquele que melhor se adequa ao escopo de sua pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Chattopadhyay S, Raines RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014 Aug; 101(8):821-33. doi:10.1002/bip.22486
2. Wang H. A review of the effects of collagen treatment in clinical studies. *Polymers*. 2021; 13:3868. doi: <https://doi.org/10.3390/polym13223868>
3. Silva TF, Penna ALB. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(3):530-9.
4. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen, CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* 2021;8: 63. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
5. Pires JR, Karam AM, Garcia VG, Ribeiro FS, Pontes AEF, Andrade CR, et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. *Rev Odontol UNESP*. 2021;50:e20210046. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04621>
6. Cunha JLS, Carvalho FMA, Filho RNP, Ribeiro MAG, Albuquerque-Junior RLC. Effects of different protocols of low-level laser therapy on collagen deposition in wound healing. *Braz Dent J [online]*. 2019 [accessed 2022 Nov 17];30(4):317-24. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902400>. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902400>.
7. Alvarenga MOP, Bittencourt LO, Mendes PFS, Ribeiro JT, Lameira OA, Monteiro MC, et al. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int J Mol Sci*. 2020 May 18;21(10):3568. doi: 10.3390/ijms21103568.
8. Bedoya SÃO, Souza MV, Conceição LG, Vitoria MIV, Valente FL, Loures FH, et al. Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfológicas: contagem de pontos e segmentação de cor. *Arq Bras Med Vete Zootec [online]*. 2019 [acesso em 2022 Nov 17];71(3): 761-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10487>. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10487>.
9. Keshri GK, Gupta A, Yadav A, Sharma SK, Singh SB. Photobiomodulation with Pulsed and Continuous Wave Near-Infrared Laser (810 nm, Al-Ga-As) Augments Dermal Wound Healing in Immunosuppressed Rats. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166705. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166705>
10. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 2008 Sept 18;92(3):144-52. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.05.008.
11. Tabakoglu HO, Sani MM, Uba AI, Abdullahi UA. Assessment of circular wound healing in rats after exposure to 808-nm laser pulses during specific healing phases. *Lasers Surg Med*. 2016; 48:409-15. doi: <https://doi.org/10.1002/lsm.22462>
12. Miot HA, Brianezi G. Análise morfológica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. *Anais Brasileiros de Dermatologia [online]*. 2010;85(3):361-4. doi: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000300010>.
13. Grissom RJ, Kim JJ. Effect sizes for research: univariate and multivariate applications. Second Ed. New York: Routledge; 2012
14. Ferguson CJ. An effect size primer: A guide for clinicians and researchers. *Professional Psychology: Research and Practice*. 2009;40(5):532-38.
15. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing; 2022. [accessed 2022 Nov 17]; Available from: <http://www.R-project.org>.
16. Souza PGC, Castro MS, Silva LP. A Biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele / The Biology of fibroblastic proliferation: excessive extracellular collagen deposition during skin injury repair. *Braz J Devel*. 2021;7(3):28989-9010. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-560>
17. Freitas KABS, Minicucci EM, Lima TO, Silva KAB, Menozzi BD, Silva VFB, et al. Efeitos da fotobiomodulação (laser de baixa intensidade) na cicatrização de feridas: revisão integrativa. *Res Soc Devel*. 2021;10(11):e362101119821. doi: 10.33448/rsd-v10i11.19821.
18. Mélló DC, Marcos RL. Terapia por fotobiomodulação modula a organização tecidual e manutenção das propriedades mecânicas em modelo experimental de lesão cutânea. [tese] São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2021. [acesso em 2022 Nov 17]. Disponível em: <http://bibliotecatede.uninove.br/handle/tede/2879>
19. Graneiro TS, Rocha CR, Carvalho LRD. Tratamento de feridas usando laser de baixa intensidade como terapia adjuvante: uma revisão integrativa da literatura. *Res Soc Dev*. 2022;11(11):e84111133276. doi: 10.33448/rsd-v11i11.33276.
20. Lopez A, Brundage C. Wound photobiomodulation treatment outcomes in animal models. *J Vet Med*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/6320515>.
21. Dantas JBdL, Martins GB, Lima HR, Carrera M, Reis SRdA, Medrado ARAP. Evaluation of preventive laser photobiomodulation in patients with head and neck cancer undergoing radiochemotherapy: Laser in patients with head and neck cancer. *Spec Care Dentist*. 2020;40: 364- 73. doi: <https://doi.org/10.1111/scd.12486>
22. Costa TF, Medrado ARAP. Efeito biomodulador do laser de baixa potência sobre a densidade vascular e fibroplasia [dissertação]. 2016. [acesso em 2022 Nov 17]; Disponível em: <https://repositorio.bahiana.edu.br:8443/jspui/handle/bahiana/746>.
23. Leal CT, Bezerra AdL, Lemos A. Efetividade do laser de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioter Pesq [online]*. 2012;19(3):290-6. doi: <https://doi.org/10.1590/S1809-29502012000300016>.
24. Prabhu V, Rao BSS, Rao ACK, Prasad K, Mahato KK. Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice. *Lasers Med Sci*. 2022;37:171-80. doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03202-z>

Submetido em: 22/11/2022

Aceito em: 30/11/2022