

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CAROLINI MENDES**

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FOTOBIMODULAÇÃO E O  
ÁCIDO HIALURÔNICO LIGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM  
MODELO DE LESÃO EPITELIAL**

**CRICIÚMA, 2019**

**CAROLINI MENDES**

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FOTOBIMODULAÇÃO E O  
ÁCIDO HIALURÔNICO LIGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM  
MODELO DE LESÃO EPITELIAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

**CRICIÚMA, 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M538e Mendes, Carolini.

Efeitos da associação entre a fotobiomodulação e o ácido hialurônico ligado a nanopartículas de ouro em modelo de lesão epitelial / Carolini Mendes. - 2019.

65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Ferimentos e lesões - Tratamento. 2. Fotobiomodulação - Uso terapêutico. 3. Ácido hialurônico - Uso terapêutico. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.83



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 324

Com início às 14h (quatorze horas) do dia quatorze do mês de junho de 2019 (dois mil e dezenove), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Carolini Mendes** sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada "EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FOTOBIMODULAÇÃO E O ÁCIDO HIALURÔNICO LIGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELO ANIMAL DE LESÃO EPITELIAL". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Alessandro Haupenthal (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15 (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emílio Luiz Streck, Coordenador Adjunto do Programa. Criciúma, 14 (quatorze) de junho de 2019 (dois mil e dezenove).

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck  
Coordenador Adjunto PPGCS  
**Prof. Dr. Emílio Luiz Streck**  
Coordenador Adjunto do PPGCS

**Fernanda Nunes Peruchi**  
Assistente Administrativo

### **Folha Informativa**

A dissertação foi elaborada seguindo a Vancouver e foi apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

## **AGRADECIMENTOS**

Talvez algum dia passou pela nossa cabeça que conseguiríamos sozinhos, o que de fato é algo impossível. Por isso agradeço primeiramente o apoio de minha família, principalmente minha mãe, a qual nunca mediu esforço algum para me ajudar a alcançar todos os meus objetivos, agradeço a Deus por uma mãe como ela. Soa clichê, mas é verdadeiro quando digo que sem ela eu nada seria. Ao meu namorado, pessoa especial, que esteve presente em toda essa jornada com os ouvidos e braços abertos, apoiando minhas decisões e sempre acreditando em mim.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Paulo, por todo o conhecimento concedido nesses anos de iniciação científica e agora no mestrado, por todos os puxões de orelhas que serviram para me deixar mais forte, por toda dedicação nos nossos trabalhos. Com certeza ter ele como orientador, amigo e professor me fez aprender muito, não só sobre a ciência, mas também sobre a vida. Não poderia deixar de mencionar todo nosso grupo de pesquisa, principalmente Gustavo, Rubya, Duda e Laura, esses colegas que são como irmãos, onde sei que sempre terei um abraço acolhedor, crescemos juntos, profissional e pessoalmente. E agradecer em especial a Daniela, pessoa de coração enorme e sempre disposta a ajudar tudo e todos.

A todos os mencionados, meu sinceros muito obrigada, saibam que vocês sempre farão parte da minha história.

*“Tente mover o mundo. O primeiro passo será mover a si mesmo”*

*- Platão*

## RESUMO

A cicatrização é o processo responsável por restaurar a integridade das estruturas internas ou externas do corpo quando há uma ruptura dos mesmos. A fotobiomodulação (FBM) se destaca como um dos recursos mais eficientes no tratamento de lesões epiteliais, assim como o ácido hialurônico (AH), que vem se destacando como uma nova molécula para o tratamento de lesões dérmicas e epidérmicas. A aplicação biológica das nanopartículas de ouro (GNPs) demonstram resultados promissores, devido à sua facilidade na permeabilidade celular e alta capacidade de aumentar o potencial terapêutico das drogas, alterando a farmacocinética, a biodistribuição ou absorção celular, além de propriedade antioxidante e anti-inflamatória, em modelos de lesão tecidual. Esse estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da associação entre FBM e o AH ligado a GNPs em modelo de lesão epitelial. Foram utilizados 50 ratos Wistar distribuídos randomicamente nos seguintes grupos: Grupo Lesão Epitelial (LE); (LE+FBM); (LE+FBM+AH); (LE+FBM+GNP); (LE+FBM+GNP-AH). Os animais foram anestesiados, em seguida tricotomizados e induzidos a uma incisão cirúrgica na região dorsal. O tratamento tópico com AH (0,9%) e/ou GNP (30mg/L) ocorreu diariamente associado com a irradiação do laser 904 nm, dose de 5 J/ cm<sup>2</sup>, o qual teve início 24 horas após a lesão e foi realizado diariamente até o sétimo dia. Para a análise da redução do tamanho da ferida foram realizadas imagens digitais e posteriormente analisadas pelo software IMAGEJ. Avaliou-se os níveis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fatores de crescimento além disso, avaliou-se parâmetros de estresse oxidativo, análise histológica através do infiltrado inflamatório, fibroblastos, novos vasos e área de produção de colágeno. Nos resultados notou-se uma redução da área das feridas, acompanhada de diminuição nos grupos tratados dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias. Os níveis de TGF- $\beta$  e FGF também aumentaram nos grupos tratados, principalmente quando se tratava do grupo com terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH). Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo os níveis de MPO, DCF e Nitrito diminuíram nos grupos tratados quando comparados ao controle, assim como o dano oxidativo (Carbonil e grupamentos Tióis). Ao contrário da defesa antioxidante teve um aumento dos grupos com as devidas terapias propostas. Por fim foi analisado cortes histológicos onde o infiltrado inflamatório foi menor no grupo LE + FBM + GNP-AH. O número de fibroblastos foi maior nos grupos tratados com FBM e FBM + AH, já a produção de colágeno que esteve maior em todos os grupos tratados. Tomados em conjunto, esses resultados nos permitem observar que a combinação do FBM + GNPs-AH otimizou a secreção de citocinas anti-inflamatórias, fatores de crescimento de proliferação e diferenciação celular, transição para a fase crônica de maneira mais precoce, contribuindo para o processo de reparo.

**Palavras-chave:** Feridas, Inflamação, Estresse oxidativo, Fotobiomodulação, Ácido Hialurônico, Nanopartículas de ouro.



## ABSTRACT

Healing is the process responsible for restoring the integrity of body's internal or external structures when they rupture. Photobiomodulation (FBM) stands out as one of the most efficient resources in the treatment of epithelial lesions, as well as hyaluronic acid (HA), which has been emerging as a new molecule for treatment of dermal and epidermal lesions. Biological application of gold nanoparticles (GNPs) have shown promising results, due to their ease in cellular permeability and high capacity to increase the therapeutic potential of drugs, altering pharmacokinetics, biodistribution or cellular absorption, as well as antioxidant and anti-inflammatory properties, in models of tissue injury. The objective of this study was to investigate the possible anti-inflammatory and antioxidant effects of the association between FBM and AH bound to GNPs in an epithelial lesion model. Wistar rats were randomly distributed in the following groups: Group epithelial lesion (LE); (LE+FBM); (LE+FBM+AH); (LE+FBM+GNP); (LE+FBM+GNP-AH), GNPs with concentration of 30 mg/L and AH of 0.9%. The animals were anesthetized, then trichotomized and induced to a surgical incision in the dorsal region. The topical treatment with HA and/or GNP occurred daily associated with irradiation of the laser 904 nm, dose of 5 J/cm<sup>2</sup>, which started 24 hours after the injury and was performed daily until the seventh day. For the analysis of wound size reduction digital images were taken and later analyzed by IMAGEJ software. The levels of proinflammatory cytokines, anti-inflammatory and growth factors were evaluated. In addition, parameters of oxidative stress, histological analysis through inflammatory infiltrate, fibroblasts, new vessels and collagen production area were evaluated. Results showed a reduction in the area of the wounds, accompanied by a decrease in the treated groups of the levels of proinflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory ones. TGF- $\beta$  and FGF levels also increased in treated groups, especially with the combination therapy group (LE + FBM + GNP-AH). In relation to oxidative stress parameters, MPO, DCF and Nitrite levels decreased in treated groups when compared to the control, as well as oxidative damage (Carbonil and Thiols groups). On the contrary the antioxidant defense had an increase of the groups with the appropriate therapies proposed. Finally, we analyzed histological sections where inflammatory infiltrate was lower in the LE + FBM + GNP-AH group. Number of fibroblasts was higher in the groups treated with FBM and FBM + AH, and the collagen production was higher in all treated groups. Taken together, these results allow us to observe that the combination of FBM + GNPs-AH optimized the secretion of anti-inflammatory cytokines, proliferation growth factors and cell differentiation, transition to the chronic phase earlier, contributing to the process of repair.

**Palavras-chave:** Wound, Inflammation, Oxidative stress, Photobiomodulation, Hyaluronic acid, Gold nanoparticles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases do reparo da pele... ..	17
Figura 2 – Citocromo c oxidase como principal foto acceptor.....	19
Figura 3 - Modelo de lesão epitelial.....	26
Figura 4 - Modelo de irradiação do laser.....	27
Figura 5 – Análise do tamanho da área.....	33
Figura 6 – Imunoensaio enzimático.....	34
Figura 7 – Determinação intracelular de MPO, ROS e NO.....	35
Figura 8 – Marcadores de dano oxidativo.....	36
Figura 9 – Dano oxidativo e defesa antioxidate.....	37
Figura 10 – Área do infiltrado inflamatório e número de fibroblastos.....	38
Figura 11 – Número de vasos sanguíneos e áreas de produção de colágeno.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AH Ácido hialurônico

ATP Adenosina Trifosfato

CAT Catalase

CD44 Receptor de adesão da superfície celular

DCFH-DA Diclorofluoresceína

DTNB Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

EDTA Acido Etilenodiamino Tetra-Acético *do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF Fator de Crescimento Epidérmico

ERN Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO Espécies Reativas de Oxigênio

GAGs Glicosaminoglicanos

GNPs Nanopartículas de ouro

GPX Glutathione Peroxidase

GSH Glutathione

H&E Hematoxilina-eosina

HAuCl<sub>4</sub> Ácido cloroáurico

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

IFN- $\gamma$  Interferon Gama

IGF1 Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IL-1 $\beta$  Interleucina 1 beta

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

LBP Laser de Baixa Potencia

LBP Laser de baixa potência

MDA Malondialdeído

NADPH Adenosina Nicotinamina Fosfato Oxidase *do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NFKb Fator nuclear Kappa B

NF- $\kappa$ B Factor Nuclear Kappa B

FBM Fotobiomodulação

PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PFA Paraformaldeído

pH Potencial hidrogeniônico

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SOD Superóxido Dismutase

TGF- $\alpha$  Fator de Crescimento de Transformação- $\alpha$

TGF- $\beta$  Fator de Crescimento de Transformação- $\beta$

TNB Tetrametilbenzidina

TNF Fator de Necrose Tumoral

VEGF Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Lesão Epitelial e Cicatrização.....	14
1.2 Laser de Baixa Potência e Fotobiomodulação .....	18
1.3 Ácido Hialurônico (AH) .....	20
1.4 Nanopartículas de Ouro (GNPs).....	22
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>24</b>
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
3.1 Procedimentos Éticos.....	25
3.2 Animais .....	25
3.3 Modelo de lesão epitelial .....	25
3.4 Tratamento.....	26
3.5 Eutanásia .....	27
3.6 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Ouro (GNPs) .....	27
3.7 Análise do Tamanho das Feridas .....	28
3.8 Imunoensaio Enzimático .....	28
3.9 Ensaios .....	29
3.9.1 Determinação intracelular de ROS e óxido nítrico .....	29
3.9.1.3 Mieloperoxidase (MPO) .....	30
3.9.2 Marcadores de dano oxidativo.....	30
3.9.3 Defesas antioxidantes .....	31
3.10 Análise Histológica.....	32
3.11 Procedimento para análise de dados.....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Análise do tamanho da área das feridas .....	33
4.2 Avaliação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento.....	33
4.3 Determinação intracelular de ROS, NO e MPO.....	35
4.4 Marcadores de dano oxidativo e antioxidantes.....	36
4.5 Análise histológica.....	38
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXO 1 – Certificado do CEUA</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO 2 – Termo de autorização para utilização da obra</b> .....	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lesão Epitelial e Cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo, servindo principalmente como uma barreira protetora contra o meio ambiente. Também ajuda a prevenir a desidratação corporal e constitui uma barreira física, limitando a penetração de agentes potencialmente nocivos nos órgãos internos (Pereira et al., 2013). É dividida em três camadas, a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme, a camada superficial, é composta principalmente de queratinócitos, mas também contém outros tipos de células, como as células de Langerhans e melanócitos, fornecendo uma barreira contra a infecção e perda de umidade (Jones et al., 2002; Metcalfe et al., 2007). A camada dérmica, situada abaixo da epiderme, é responsável pela elasticidade e integridade mecânica da pele. Contém matriz extracelular vascularizada (MEC) rica em colágeno, elastina e glicosaminoglicanos. Possui como componentes celulares fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas e mastócitos (Jones et al., 2002; Supp e Bocy, 2005; Metcalfe et al., 2007). A hipoderme, localizada abaixo da derme, é composta principalmente de tecido adiposo e colágeno e atua principalmente como fonte de energia (Bottcher-Haberzeth et al., 2010; Metcalfe et al., 2007; Yildirimer et al., 2012).

As feridas são caracterizadas por lesões geradas a partir da ruptura da integridade do tecido cutâneo (Baum e Arpey, 2005). Sendo a pele vulnerável a diferentes tipos de lesões, como queimaduras, feridas crônicas (úlceras), feridas agudas (cirúrgicas), tumores e outras condições dermatológicas (Dai et al., 2004; Groeber et al., 2011). O reparo dessas lesões inicia-se cerca 24 horas após a lesão, com a migração dos fibroblastos, num processo chamado de cicatrização de feridas, responsável por restaurar a integridade das estruturas internas ou externas do corpo (Sengupta et al., 2015). Em 3-5 dias, uma característica do processo de cura é o surgimento do tecido de granulação, com aparência histológica caracterizada pela proliferação de fibroblastos e por novos e delicados capilares de paredes finas (angiogênese) em MEC frouxa, frequentemente com células inflamatórias, principalmente neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, que servem como células efetoras imunológicas, bem como uma fonte de citocinas e fatores de crescimento (Gillitzer e Goebeler, 2001). A ativação destas células faz com que a

cicatrização seja executada através de uma ordem cronológica, como mostrado na figura 1 (Shaw e Martin, 2009), envolvendo a diferenciação, migração, proliferação e apoptose de vários tipos de células para se obter o melhor reparo tecidual possível (Bielefeld et al., 2013).

A cicatrização é descrita como quatro estágios sobrepostos e precisamente coordenados: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. A homeostase inicia quando a barreira epidérmica é violada (Boushton et al., 2006), tal hemostasia forma a resposta imediata à lesão e funciona para prevenir a perda de sangue no local da ferida. As plaquetas são essenciais à formação do tampão hemostático, secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento liberados na área lesada, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de transformação- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), além de glicoproteínas de adesão como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular (Dvorak et al., 2002; Park et al., 2004). A lesão vascular inicia uma cascata de eventos que termina na coagulação e abrange a constrição vascular, a agregação, degranulação de plaquetas e, finalmente, a formação de um coágulo de fibrina (Clark, 1996; Guo e Dipietro, 2010; Schultz et al., 2011). O coágulo de fibrina também atua como uma matriz provisória para a migração inicial de células inflamatórias para a ferida.

A fase inflamatória inicia logo após a lesão tecidual com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos, sendo essas, as primeiras células responsáveis pela resposta inflamatória a chegarem ao tecido lesado, seguidos por monócitos e linfócitos. Essas células inflamatórias são atraídas para o local da lesão por citocinas, incluindo TGF $\beta$  e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Singer e Clark, 1999; Guo e Dipietro, 2010). Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana), auxiliam na limpeza da área lesada produzindo radicais livres que são essenciais para proteger o organismo contra bactérias invasoras e outros microrganismos (Silva et al., 2010). É durante a fase inflamatória que ocorre a maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) através da bomba respiratória, estimulada pela migração de neutrófilos e macrófagos. Adicionalmente, os fibroblastos também secretam ERO quando são estimulados por citocinas pró-

inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e fatores de crescimento como EGF e PDGF (Kanta et al., 2011).

Os macrófagos migram para a ferida de 48 a 96 horas após a lesão, essa migração celular tem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem para angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição na fase proliferativa (Broughton et al., 2006). O término da liberação de citocinas pró-inflamatórias acontece cerca de 4 dias após a lesão, inicia-se o processo de reparo, nesta etapa temos liberação de citocinas anti-inflamatórias (interleucina-10/ IL-10 e Interleucina/ IL-4). Enquanto os macrófagos fagocitam organismos estranhos, partículas e neutrófilos mortos, eles também liberam TGF $\beta$  e outras citocinas, como interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) e o TNF- $\alpha$ , que possuem um papel importante como parte do mecanismo de recuperação/reparo do tecido, além de estimular o movimento de fibroblastos e células epiteliais para a ferida iniciando a fase proliferativa (Singer e Clark, 1999; Mahdavian Delavary et al., 2011).

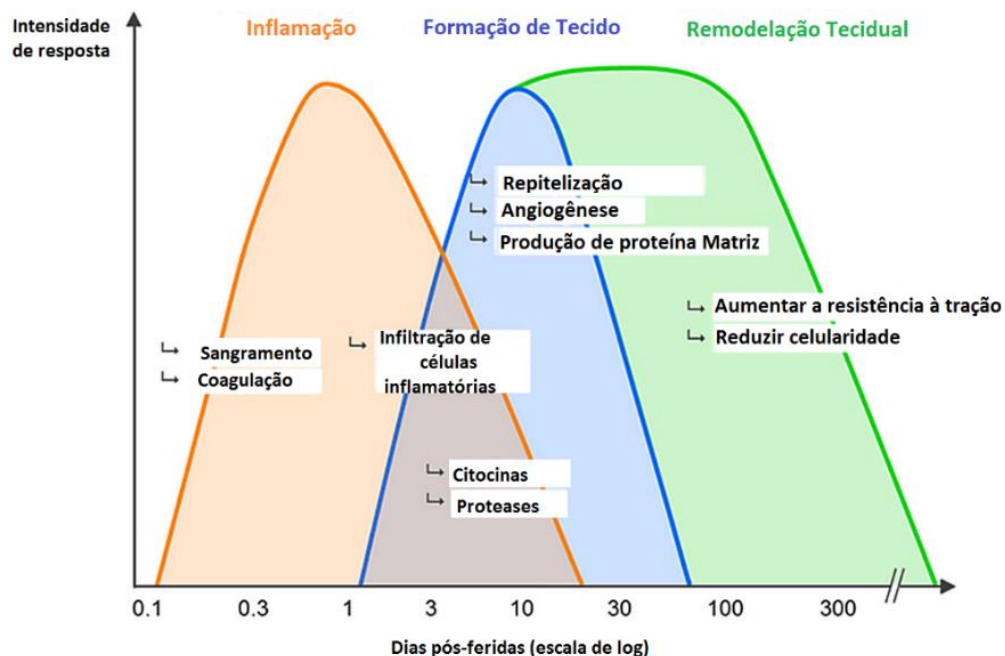
A fase proliferativa ou de granulação, é caracterizada pela reepitelização da epiderme e pelo reparo da camada dérmica ou mesenquimal subjacente. Ocorre em quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Inicia quatro dias após a lesão, e se estende até o término da segunda semana. A derme é restaurada por fibroblastos invasores e proliferantes que sintetizam e secretam proteínas da matriz extracelular embrionária e também liberam fatores de crescimento como TGF- $\beta$ 1 (Clark, 1990; Clark, 1996; Leask e Abraham, 2004). A angiogênese é estimulada pelo TNF- $\alpha$  e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essenciais para a cicatrização adequada. Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida, a seguir ocorre proliferação dessas células, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (Mandelbaum et al., 2003).

Durante a fase proliferativa do reparo da ferida, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (Van, 1967). A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência (Li et al., 2005). O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF, em seguida é liberado o TGF- $\beta$ , que estimula



os fibroblastos a produzirem colágeno do tipo I e a transformar-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (Barrientos et al., 2008).

Na fase de maturação ou remodelamento, ocorre a deposição de colágeno de forma organizada. O colágeno que é produzido de forma inicial apresenta espessura com menor diâmetro do que o colágeno existente na pele normal. Durante a fase de remodelação, a formação de tecido de granulação cessa, devido a apoptose das células responsáveis (Mandelbaum et al., 2003; Profyris et al., 2012). Com a maturação da ferida, a composição da matriz extracelular sofre alterações. O colágeno tipo III depositado durante a fase proliferativa é lentamente degradado e substituído por colágeno mais forte, tipo I. Este tipo de colágeno é orientado como pequenos feixes paralelos, que diferem drasticamente da orientação tecidual do colágeno presente na derme normal. Em direção aos estágios finais da cicatrização, a ferida sofre uma resposta contrátil através da ação dos miofibroblastos. Em virtude de seus múltiplos pontos de ligação ao colágeno, essas células ricas em actina contraem e reduzem a área da superfície da cicatriz (Gurtner, 2007). O sucesso do reparo tecidual ocorrerá quando houver equilíbrio entre a síntese e lise da antiga e da nova matriz (Lorena D et al., 2002).



**Figura 1: Fases do processo de reparo da pele.** O processo de cicatrização de feridas é tipicamente descrito como a sucessão de três fases sobrepostas: inflamação, formação de tecido (ou fase de proliferação) e remodelação do tecido. (Fonte: Adaptado de Rittié, 2016).

## 1.2 Laser de Baixa Potência e Fotobiomodulação

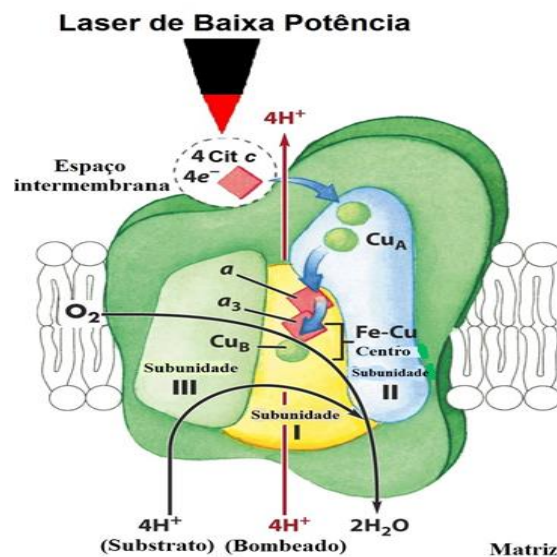
O desenvolvimento de abordagens cada vez mais eficientes para o reparo tecidual vem sendo muito estudado, ocorrendo assim a minimização dos fatores que retardam ou impedem o processo de cicatrização (Guo e Dipietro, 2010). A laserterapia de baixa potência é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminescentes monocromáticos de intensidade relativamente baixa, para tratamento de afecções e lesões, geralmente consideradas demasiadamente baixas para que não efetuem qualquer aquecimento detectável dos tecidos irradiados (Kitchen e Bazin, 1998; Dall Agnol et al., 2009; Medeiros et al., 2010). A terapia de fotobiomodulação é uma intervenção não farmacológica, que consiste em aplicar uma forma de luz não ionizada, a qual inclui laser (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), diodos emissores de luz e outras luzes com um espectro mais amplo que varia de visível a infravermelho (Anders et al., 2015).

A FBM é utilizada por profissionais como dentistas e acupunturistas, por acelerar a cicatrização e reduzir a dor e inflamação. O primeiro estudo sobre o uso do laser em tecido mole foi realizado por Mester et al. (1971). A FBM é utilizada no tratamento de lesões dérmicas como feridas e úlceras, situações pós-cirúrgicas, contusões musculares, artrite crônica, dermatose, situações de isquemia, dor crônica, entre outras (Lins et al., 2010). Na prática clínica de lesões musculares, o uso do LBP teve seu início mais recente em relação ao uso em lesões dérmicas, mas os resultados vêm mostrando efeitos satisfatórios na aceleração da cicatrização desses tipos de lesões (Karu et al., 1998; Tunér e Hode, 2010).

A FBM se destaca como um dos recursos mais eficientes no tratamento de lesões epiteliais. Não produz calor uma vez que ocorre a incidência do seu feixe de luz sobre a pele, isto é, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (Karu, 1999). Assim, em nível celular, A FBM induz alterações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas. Seus efeitos podem ser observados no comportamento dos linfócitos aumentando sua proliferação e ativação; nos macrófagos com aumento da fagocitose; e nos fibroblastos aumentando a secreção de fatores de crescimento e aumentando a absorção tanto de fibrina como colágeno (Andrade, 2014). A absorção molecular da luz do laser permite um aumento no metabolismo celular caracterizado pela estimulação de fotorreceptores ou aceptores de elétrons na cadeia respiratória

mitocondrial, alterações nas concentrações de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno (Wong-Riley et al., 2005).

Alguns estudos têm sugerido que a mitocôndria é o principal alvo do laser em tecido epitelial (Eels, 2004; Silveira et al., 2007; Gupta et al., 2011). Outros estudos destacam a importância da FBM na regeneração muscular (Shefer et al., 2001; Silveira et al., 2009; Baptista et al., 2011; Silva et al., 2011). A proteína citocromo c oxidase (polipeptídeo do complexo IV da cadeia respiratória) é um cromóforo que tem propriedades de absorver a luz irradiada de um determinado comprimento de onda (Karu et al., 2004; Karu et al., 2008; Santana-Blank et al., 2010). O aumento na atividade enzimática desta proteína após irradiação com LBP tem sido demonstrado em vários estudos, bem como um aumento na síntese de ATP após irradiação de mitocôndrias isoladas (Yu et al., 1997; Santana-Blank et al., 2010; Karu, 2010; Chen et al., 2011).



**Figura 2: Possível mecanismo de ação do laser na mitocôndria.** Moléculas com cobre em sua composição são excitadas pelo laser, dessa maneira aumentam a taxa de transferência de elétrons do citocromo c oxidase (Adaptado de Karu, 1999).

As moléculas que possuem cobre em sua composição no complexo IV da cadeia respiratória, CuA e CuB, são considerados como fotoceptores, podendo ser oxidados ou reduzidos e assim aumentar a taxa de transferência de elétrons do citocromo c oxidase (Karu, 1999) (Figura 2). Uma das vias de sinalização do LBP estaria ligada a excitação da molécula fotoceptora, que parece estimular o metabolismo celular através de cascatas de reações de sinalização celular ou sinalização mitocondrial retrógrada. A sinalização retrógrada (oposta ao caminho

comum), leva informações do núcleo e do citoplasma para a mitocôndria. Assim, a sinalização retrógrada envia informações de volta ao núcleo sobre mudanças no estado funcional da mitocôndria (Karu, 2008). Uma destas cascatas envolve a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico do citocromo *c* oxidase onde age como um inibidor. Quando a atividade da enzima é reduzida pela irradiação com LBP, o óxido nítrico dissocia-se do centro catalítico, e esse evento poderia transitoriamente diminuir essa inibição (Karu, 2010).

O aumento na concentração de ATP no tecido irradiado seria a outra via de sinalização ativada pelo laser a partir da mitocôndria. Em músculo esquelético após irradiação com diferentes comprimentos de onda, mostrou aumento na produção de ATP em mitocôndrias isoladas (Yu et al., 1997; Tafur et al., 2008; Gao e Xing, 2009). O ATP, a moeda energética celular, é essencial para a homeostasia celular, e sabe-se que pequenas mudanças nas suas concentrações podem resultar em alterações significativas no metabolismo celular (Baratto et al., 2010).

A aplicação do laser no tecido lesado também parece modular o processo inflamatório. A redução na densidade das células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos nos tecidos epitelial e muscular lesionados foi demonstrada após irradiação com laser de baixa potência em ratos Wistar (Vinha et al., 2011; Mesquita-Ferrari et al., 2011). Há estudos que mostram diminuição da produção de ERO na fase aguda da lesão muscular e epitelial, após uso da laserterapia. Isso se deve principalmente por acelerar o processo inflamatório e assim diminuir a exposição celular a ERO. Outra característica é a diminuição da ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  como também aumento na IL-10 que é anti-inflamatória (Pires et al., 2012; Basso et al., 2012). Os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelo laser parecem ocorrer através de aceleração de microcirculação resultando em mudanças na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários da inflamação (Da Silva et al., 2010).

### **1.3 Ácido Hialurônico (AH)**

O ácido hialurônico (AH) vem se destacando como uma nova tecnologia para o tratamento de lesões dérmicas e epidérmicas (Longinotti, 2014). Um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos (GAGs) e consiste de uma unidade básicas

de dois açúcares, ácido glucurônico e N-acetilglucosamina. Componente importante da matriz extracelular, presente em altas concentrações na cartilagem e no líquido sinovial (Neuman et al., 2015), nas articulações, tendões, bainhas, além da pleura e pericárdio. Está presente ainda em tecidos diversos, tais como a pele, onde está localizado a sua maior concentração (Salwowska et al., 2016).

As propriedades higroscópicas e viscoelásticas do AH e seus derivados desempenham um papel vital no processo de cicatrização de feridas, pois este lubrifica as células do corpo (Necas et al., 2008), uma vez que é fortemente encontrado na matriz extracelular, a qual se liga à água formando um reservatório de água na derme (Dicker et al., 2014). Devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, lubrificante articular e anti-adesivo celular, tem diversas aplicações clínicas, incluindo injeção intra-articular para osteoartrose, aumento de tecido mole em tratamentos estéticos (Friedman, 2002), cicatrização de feridas, e prevenção de aderências após cirurgias (Zeng et al., 2007).

O AH possui a função de estimular o desenvolvimento de fibrina, a atividade fagocitária, a mobilidade dos neutrófilos, dos macrófagos e a liberação de fatores quimiotáticos (migração) para os fibroblastos, que contribuem durante a fase de granulação para cicatrização de feridas (Anderson, 2001; Tammi e Tammi, 2004). Enquanto os fibroblastos são responsáveis por sintetizar o AH presente na matriz extracelular, o CD44 trabalha como o principal receptor de AH. Desta maneira irá ocorrer a regulação do crescimento celular, diferenciação, aderência e síntese de colágeno (Nawratet al., 2005).

Quando o AH liga-se ao seu receptor CD44, afeta diretamente a função celular e regula positivamente a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), importante fator de crescimento estimulante de colágeno (Aruffo et al., 1990; Noble et al 1993), nas células endoteliais este mecanismo contribui para a estimulação da produção de colágeno (Rooney et al., 1993). Entre as ações do ácido hialurônico temos os efeitos antiinflamatório, através da diminuição da expressão gênica de citocinas, produção de prostaglandinas e concentração intra-articular de metaloproteinases, estabilização da matriz cartilaginosa, proliferação de condrócitos, aumento da produção de colágeno tipo II e sua diminuição da degradação (Conrozieret al., 2009; Pavelka e Uebelhart, 2011), além de estimular a síntese de componentes da matriz de cartilagem e inibir enzimas condro-degenerativas, reduzindo o processo inflamatório (Ye et al., 2018).

#### 1.4 Nanopartículas de Ouro (GNPs)

Outra abordagem que vem sendo utilizada na parte experimental como agente antioxidante e anti-inflamatório são as nanopartículas de ouro (GNPs). A nanotecnologia é um campo em desenvolvimento e possui um enorme potencial para impactar positivamente no sistema de saúde. Importantes aplicações da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o conhecimento básico da interação dos nanomateriais com as células e suas consequências biológicas estão começando a evoluir (Bhattacharya, 2008; Arvizo et al., 2012).

Vários métodos estão disponíveis para a síntese de nanopartículas com tamanho controlado e morfologia que permite o aprisionamento de uma ampla variedade de moléculas bioativas e sua liberação controlada (Malam et al., 2009; Ahn et al., 2013). Atualmente, as GNPs são amplamente utilizadas para a distribuição de várias moléculas bioativas melhorando a eficiência do fármaco, devido a sua distribuição direcionada, toxicidade reduzida e captação aumentada. A utilização das nanopartículas no campo biomédico tem demonstrado interesse devido à sua estabilidade química; facilidade de síntese e processo de fabricação; biocompatibilidade genuína e não interferência com outros biomateriais; bioconjugação de superfície com sondas moleculares; propriedades ópticas marcantes e baixa citotoxicidade (Shukla et al., 2005; Kim et al., 2010; Arunachalam et al., 2014). As mesmas são consideradas excelentes carreadoras de proteínas e biomoléculas, sendo que quanto mais distribuída, melhor a sua ação terapêutica (Ghosh et al., 2017).

As GNPs vêm sendo utilizadas no tratamento de diferentes doenças devido às suas capacidades antioxidante e anti-inflamatória em modelos de lesão tecidual (Victor, 2012). Seu efeito anti-inflamatório foi demonstrado através da aplicação de gel de diclofenaco de dietilamônio associado às GNPs em uma lesão tendínea onde ocorreu um sinergismo entre os mesmos e pela aplicação via iontoforese, ocorrendo diminuição dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Dohnert, 2012). Um trabalho realizado pela primeira vez por Sumbayev et al. (2013), demonstrou que as nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato diminuíram, de maneira dependente do tamanho, a resposta celular induzida por IL-1 $\beta$  *in vitro* e *in vivo*. O estudo mostrou sua capacidade de interagir fisicamente com IL-1 $\beta$  e dessa maneira consegue neutralizar a sua ligação com seu receptor de membrana inibindo sua cascata de sinalização.

As GNPs tornam-se agentes antioxidantes fortes e desempenham um papel importante na cicatrização de feridas (Li, 2015). Num estudo recente, investigou-se o efeito de nanopartículas de ouro na terapia de Laser de baixa potência (LBP) no processo de cicatrização de feridas. O grupo de ratos submetidos a GNPs com LBP mostrou uma aceleração significativa do fechamento da ferida em comparação com outros grupos. Os resultados histológicos indicam que o grupo GNPs e LBP é mais eficaz na estimulação da angiogênese e desencadeia a resposta inflamatória em estágio inicial (Lau et al., 2017). Em outro estudo, Akturk et al. (2016) avaliou um novo nanocomposto de nanopartículas de colágeno/ouro como um potencial biomaterial de cicatrização de feridas cutâneas. Avaliou-se suas propriedades estruturais e morfológicas, biocompatibilidade *in vitro* e efeitos *in vivo* como indução ou inibição das respostas inflamatórias, influenciando o fechamento da ferida e sua possível contribuição para o aumento da reepitelização, neovascularização e formação de tecido de granulação.

De acordo com Barathmanikanth (2010) as nanopartículas de ouro também inibem a formação de espécies reativas de oxigênio, agindo como antioxidante. Segundo o estudo realizado por Kim et al. (2015) a aplicação tópica de GNPs acelera significativamente os processos de cicatrização desempenhando aumento significativo da expressão do colágeno, VEGF, além de outros fatores, ocorrendo o fechamento da ferida quatro vezes mais rápido no que nos demais grupos.

Considerando que a atuação conjunta das abordagens descritas na otimização da cicatrização cutânea ainda não foi avaliada, o objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios da associação do FBM e AH-GNPs em um modelo de lesão epitelial animal.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Investigar os efeitos da associação entre FBM e o AH ligado a GNPs em modelo de lesão epitelial.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos da associação entre a FBM e o AH ligado a GNPs sobre a área (cm<sup>2</sup>) da ferida e quantificar a contração do tecido epitelial;
- Avaliar os efeitos da associação entre FBM e o AH ligado a GNPs sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fatores de crescimento (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, TGF $\beta$  e FGF);
- Avaliar os efeitos da associação entre a FBM e o AH ligado a GNPs sobre a produção de oxidantes, sistema antioxidante e dano oxidativo em um modelo de lesão epitelial;
- Avaliar os efeitos da associação entre o FBM e o AH ligado a GNPs sobre a resposta inflamatória e produção de colágeno através de análise histológica em um modelo de lesão epitelial;



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Procedimentos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob protocolo nº 027/2018-1, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

#### 3.2 Animais

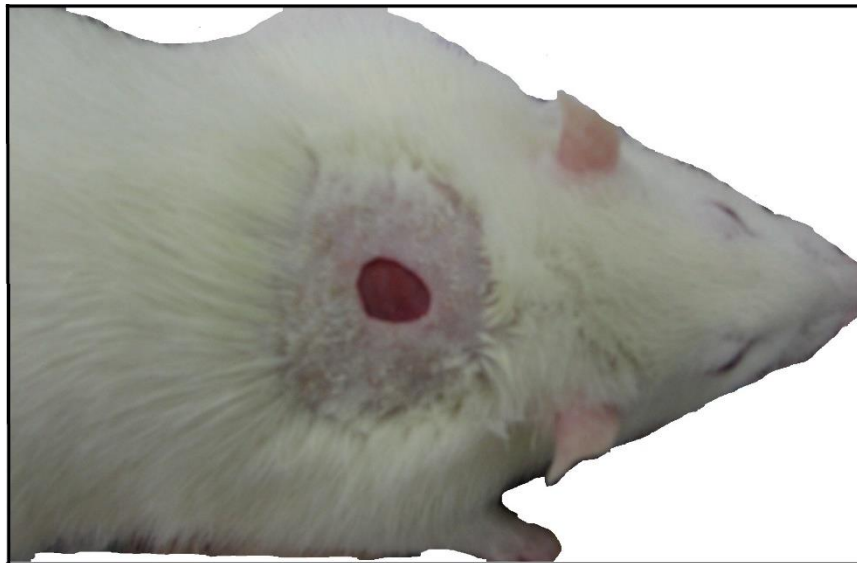
Foram utilizados 50 ratos Wistar com as seguintes características: 60 dias de vida, com peso entre 250-300 g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (Comprimento 30 cm x Largura 20 cm x Altura 13 cm), distribuídos em seis animais por caixa, colocados sobre estantes aos cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre  $20 \pm 22$  °C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso. Os ratos foram alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*. Os animais foram distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais (n=10):

- (LE) grupo lesão epitelial - sem tratamento local ou sistêmico;
- (LE + FBM) lesão epitelial e tratamento com FBM 904nm e dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ ;
- (LE + FBM + AH) FBM + tratamento tópico com ácido hialurônico 0,9%;
- (LE + FBM + GNP) FBM + tratamento tópico com GNPs de 20 nm [30 mg/L];
- (LE + FBM + GNP-AH) FBM + tratamento tópico com AH ligado a GNPs.

#### 3.3 Modelo de lesão epitelial

O modelo de lesão epitelial foi induzido como descrito por Carvalho et al. (2006). Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. A região dorsal de cada animal foi tricotomizada, limpada e desinfetada com álcool 70%. A região medial-dorsal, entre a linha infraescapular e a cauda, foi removida com uma incisão cirúrgica

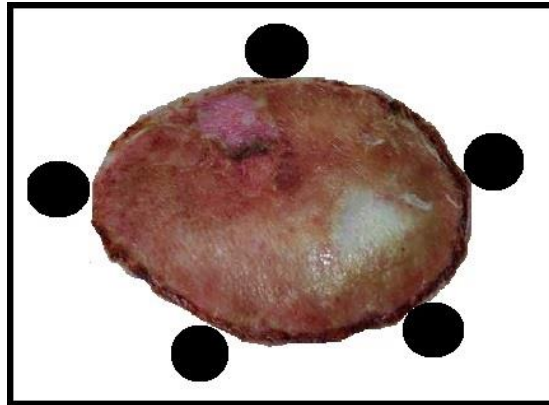
de forma circular com diâmetro de aproximadamente 1 cm. As feridas foram uniformes em diâmetro, profundidade e localização.



**Figura 3 – Modelo de lesão epitelial.** A imagem apresenta a lesão epitelial após incisão cirúrgica na região dorsal dos animais.

### 3.4 Tratamento

No estudo foi utilizado o laser AsGa com emissão pulsada (comprimento de onda 904 nm; potência de pico 70W; frequência 9.500 Hz; tempo de pulso 60 ns; tamanho do feixe de 0,10 cm<sup>2</sup>; densidade de força 0,4/cm<sup>2</sup> e dose de 5 J/cm<sup>2</sup>) da empresa Laserpulse-lbramed (São Paulo, Brasil). A irradiação foi executada em cinco regiões distintas ao redor da ferida, com a caneta do laser perpendicular à pele numa distância de 0,5 cm por ponto, conforme é descrito por Morrone et al., (1998). A primeira sessão iniciou 24 horas após a lesão e foi realizada diariamente até o sétimo dia. O tratamento tópico foi realizado com AH (0,9%), GNP (30 mg/L) e GNP-AH onde adicionou-se sob agitação mecânica 0,9% de AH às GNPs a 500 rpm até formar o gel. O tratamento ocorreu diariamente durante uma semana com uma aplicação tópica diária, e logo após foi feita a irradiação do laser. A eficácia do protocolo foi avaliada após um período de cicatrização de 7 dias. Todos os animais foram anestesiados durante o tratamento com isoflurano 4% na forma inalatória para assegurar a imobilização e aplicação correta dos tratamentos.



**Figura 4: Modelo de irradiação do laser.** A figura exemplifica os pontos onde no tratamento foi irradiado o laser, em cinco regiões das bordas da ferida. (Adaptada de Cuttle et al., 2006).

### 3.5 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados doze horas após a última aplicação do laser e do AH e/ou GNPs. A partir disso, a borda externa da ferida foi cirurgicamente removida e imediatamente processada e armazenada em freezer -70 °C para posterior análise.

### 3.6 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Ouro (GNPs)

A síntese das nanopartículas foi realizada e cedida pelo grupo biotecnologia peptídica aplicada ao desenvolvimento de novo fármacos do professor Ricardo Andrez Machado de Ávila - laboratório de fisiopatologia experimental – UNESC. As GNPs de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das GNPs foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90°C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada

tamanho de GNPs sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também foi ajustada.

### 3.7 Análise do Tamanho das Feridas

O método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. Imagens digitais das feridas foram feitas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas nos dias 0 e 7 do tratamento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho delas (área, comprimento e largura) calculando a variação das áreas das feridas neste período em cm<sup>2</sup>. Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 5 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio.

### 3.8 Imunoensaio Enzimático

A fim de determinar-se a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi realizado o Imunoensaio de imunoabsorbância enzimática - ELISA sanduiche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente preparadas, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando *overnight* a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, afim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo de detecção, o qual se ligou aos antígenos da amostra formando assim um “sanduiche” de anticorpo e amostra.

Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-se um substrato cromogênico, o Tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emitiu uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50 microlitros por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10) e fatores de crescimento (TGF- $\beta$  e FGF) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

### **3.9 Ensaios**

#### **3.9.1 Determinação intracelular de ROS e óxido nítrico**

##### **3.9.1.1 Diclorofluoresceína - DCFH-DA**

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente por Dong (2010), com algumas modificações.

##### **3.9.1.2 Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)**

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). Os resultados foram calculados em  $\mu\text{mol Nitrito/mg proteína}$  (Chae et al., 2004).

### **3.9.1.3 Mieloperoxidase (MPO)**

Foi avaliada a atividade da MPO como marcador secundário de infiltração de neutrófilos. A atividade MPO na pele foi medida em tecido homogeneizado (50mg/mL) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% centrifugado a 15000g durante 40min. A suspensão foi então homogeneizada três vezes por 30s. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM de tetrametilbenzidina e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da MPO foi medida espectrofotometricamente como a alteração na absorbância a 650nm a 37°C.

### **3.9.2 Marcadores de dano oxidativo**

#### **3.9.2.1 Conteúdo de Sulfidrila**

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra utilizou-se o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

#### **3.9.2.2 Carbonilação de Proteínas**

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gerou a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup>.

### **3.9.3 Defesas antioxidantes**

#### **3.9.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)**

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenato de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 ul foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

#### **3.9.3.2 Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

#### **3.9.3.3 Glutathione (GSH)**

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogenato de tecido epitelial após precipitação de proteína com 1mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µm DTNB. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

#### **3.9.3.4 Conteúdo de Proteínas**

O teor de proteína a partir do homogenato de tecido epitelial foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para se ligar à proteína. Absorbância foi lida a 750nm.

### **3.10 Análise Histológica**

As amostras de tecido epitelial foram embebidas em solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras foram removidas e pós-fixadas por 24 h na mesma solução (PFA 4%), e em seguida embebidas em parafina após desidratação e diafanização, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. As análises histológicas da infiltração leucocitária, fibroblastos, vasos sanguíneos e depósito de colágeno foram realizadas com hematoxilina-eosina e luxolfast blue, respectivamente. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte (4 animais/grupo) foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (DO) (Chalk et al., 1994).

### **3.11 Procedimento para análise de dados**

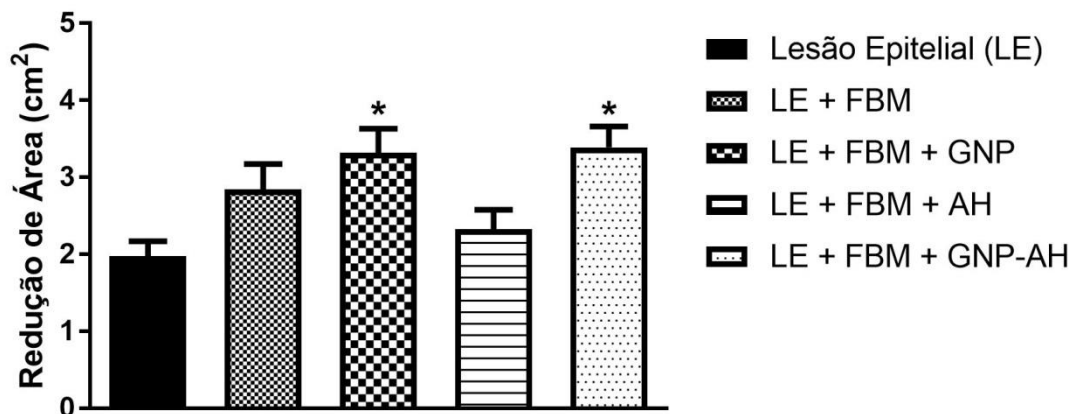
Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de  $P < 0,05$ . Utilizou-se o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise do tamanho da área das feridas

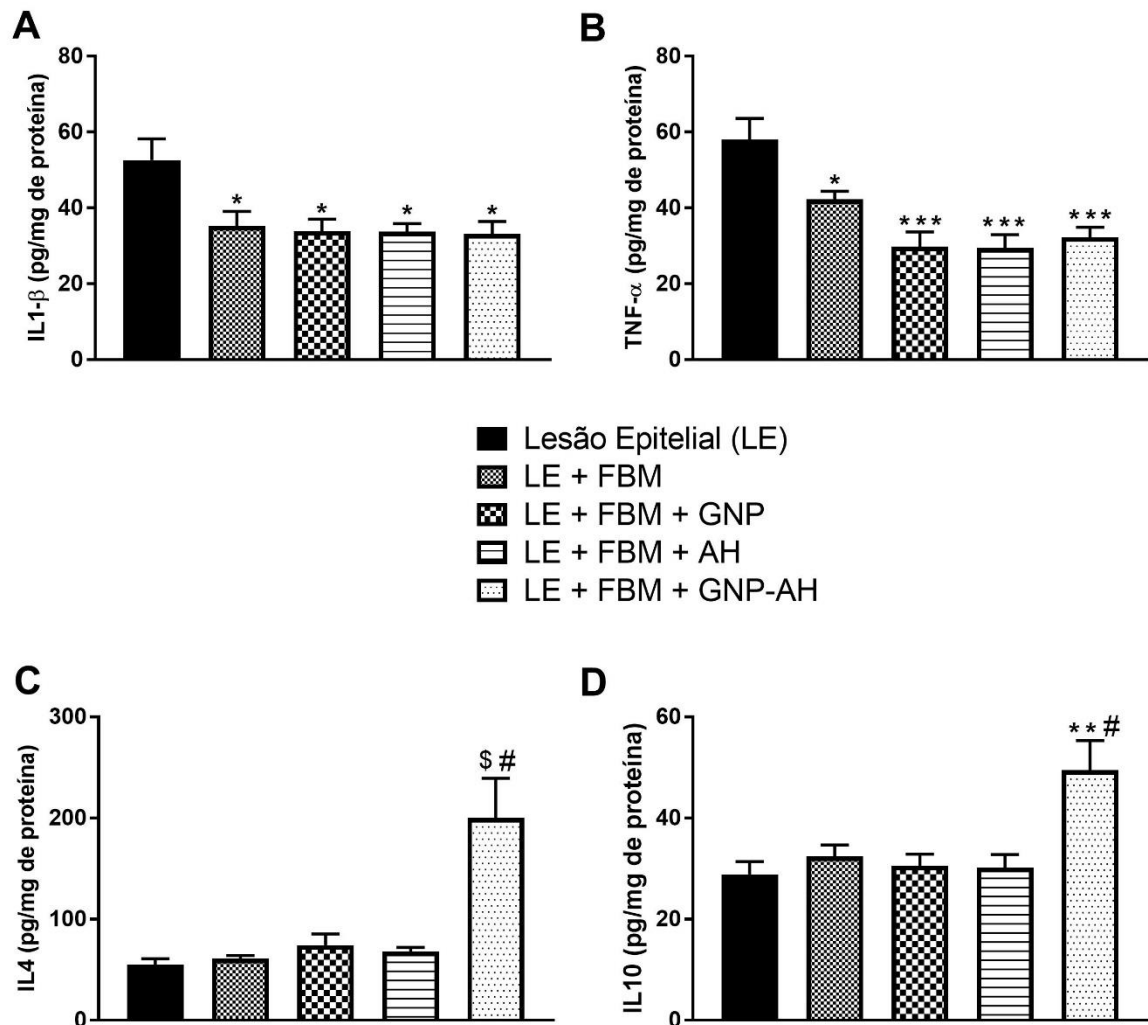
Inicialmente avaliamos o tamanho da área da ferida, representada pela redução da área (figura 5), onde os grupos LE + FBM + AH e LE + FBM + GNP-AH demonstraram aumento na redução da área quando comparados ao grupo controle; os grupos LE + FBM e LE + FBM + GNP não demonstraram diferença significativa quando comparados ao grupo lesão epitelial.



**Figura 5:** Efeitos do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNP's sobre parâmetros de redução da área das feridas. Os dados são apresentados em Média ± EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

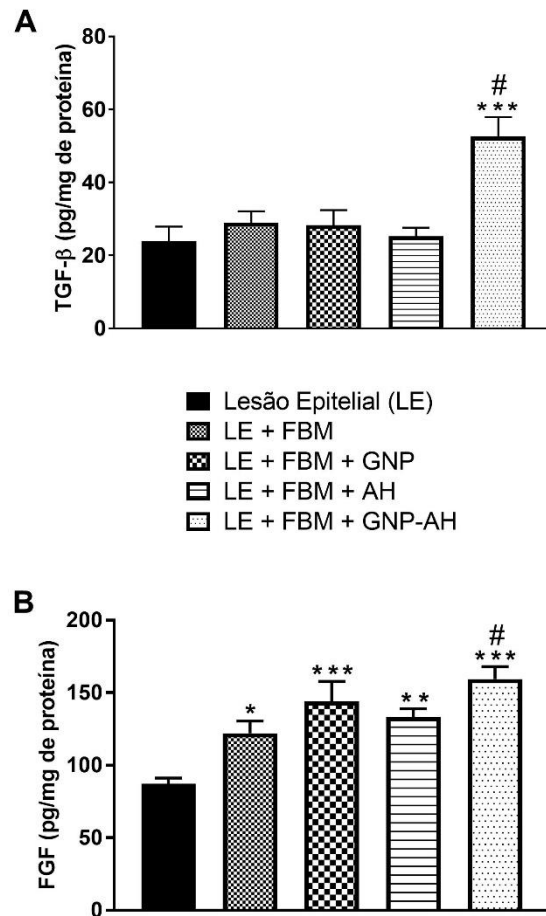
### 4.2 Avaliação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento

Na figura 6 estão representados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (figura 6 A e 6 B) e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Observou-se que os níveis de IL-1 $\beta$  em todos os grupos tratados obtiveram uma diminuição significativa comparados ao LE (valor de  $p < 0,05$ ). Em relação aos níveis de TNF- $\alpha$  o grupo LE + FBM diminuiu em relação ao grupo LE ( $p < 0,05$ ) e os demais grupos tratados (LE + FBM + GNP; LE + FBM + AH; e LE + FBM + GNP-AH) apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo LE. Já em relação aos níveis de IL-4 apenas o grupo terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH) apresentou diferença significativa comparada ao grupo LE ( $p < 0,0001$ ) e ao grupo LE + FBM. Os níveis de IL-10 no grupo LE + FBM + GNP-AH obtiveram um aumento compara ao grupo LE ( $p < 0,001$ ) e quando comparado ao grupo LE + FBM.



**Figura 6:** Efeitos do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNP's sobre os níveis proteicos de interleucinas pró-inflamatórias: IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL4 e IL6. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

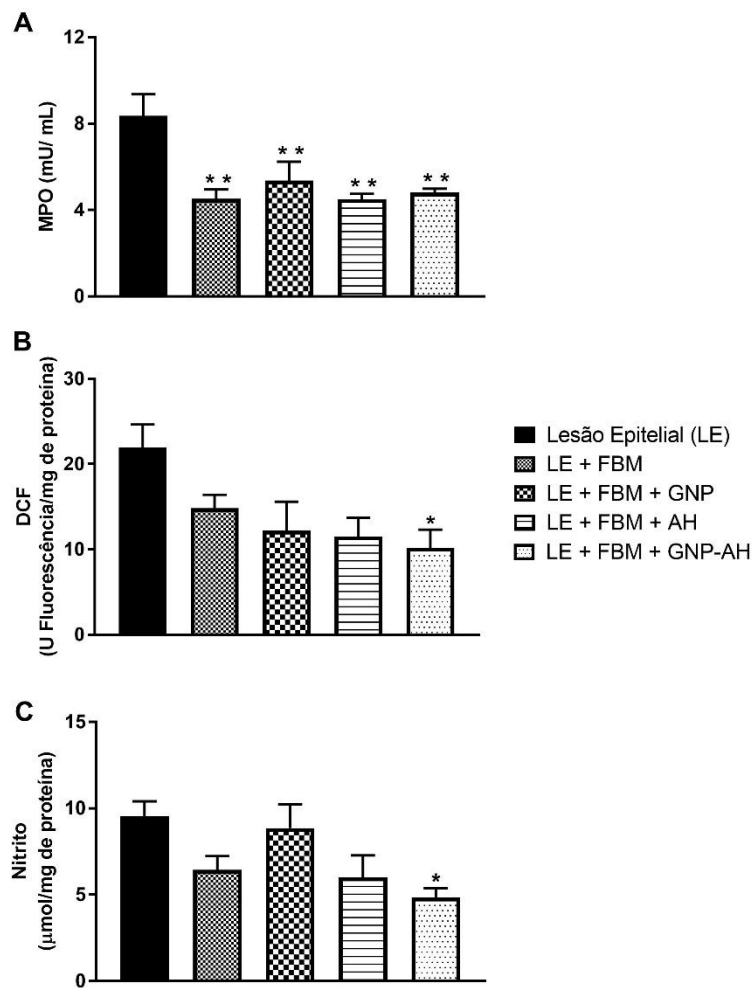
A figura 7 demonstra os resultados referentes aos fatores de crescimento TGF- $\beta$  (figura 7 A) e FGF (figura 7 B). Em relação aos níveis de TGF- $\beta$  o grupo terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH) teve um aumento significativo comparado ao grupo LE ( $p < 0,001$ ) e ao grupo LE + FBM. Já em relação aos níveis de FGF o grupo LE + FBM apresentou um aumento significativo em relação ao grupo LE ( $p < 0,05$ ), os grupos LE + FBM + GNP e LE + FBM + GNP-AH tiveram um aumento ( $p < 0,001$ ) comparados grupo LE, sendo que o grupo terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH) os níveis de FGF também aumentou quando comparado ao grupo LE + FBM. E por fim o grupo LE + FBM + AH apresentou um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) comparado ao grupo LE.



**Figura 7:** Efeitos do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNP's sobre os níveis de fatores de crescimento: TGF-β e FGF. Os dados são apresentados em Média ± EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

### 4.3 Determinação intracelular de ROS, NO e MPO

Os níveis de MPO, DCF e Nitrito foram analisados como parâmetros oxidativos. Na figura 8 A avaliou-se os níveis de mieloperoxidase e pode-se observar que todos os grupos tratados apresentaram níveis menores que o grupo lesão epitelial com valor de  $p < 0,01$ . Na figura 8 B observamos que apenas o grupo LE + FBM + GNP-AH apresentou diferença significativa comparada ao grupo LE ( $p < 0,05$ ). Assim como na figura 8 C, onde apenas o grupo terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH) teve seus níveis de nitrito diminuídos comparado ao grupo LE ( $p < 0,05$ ).

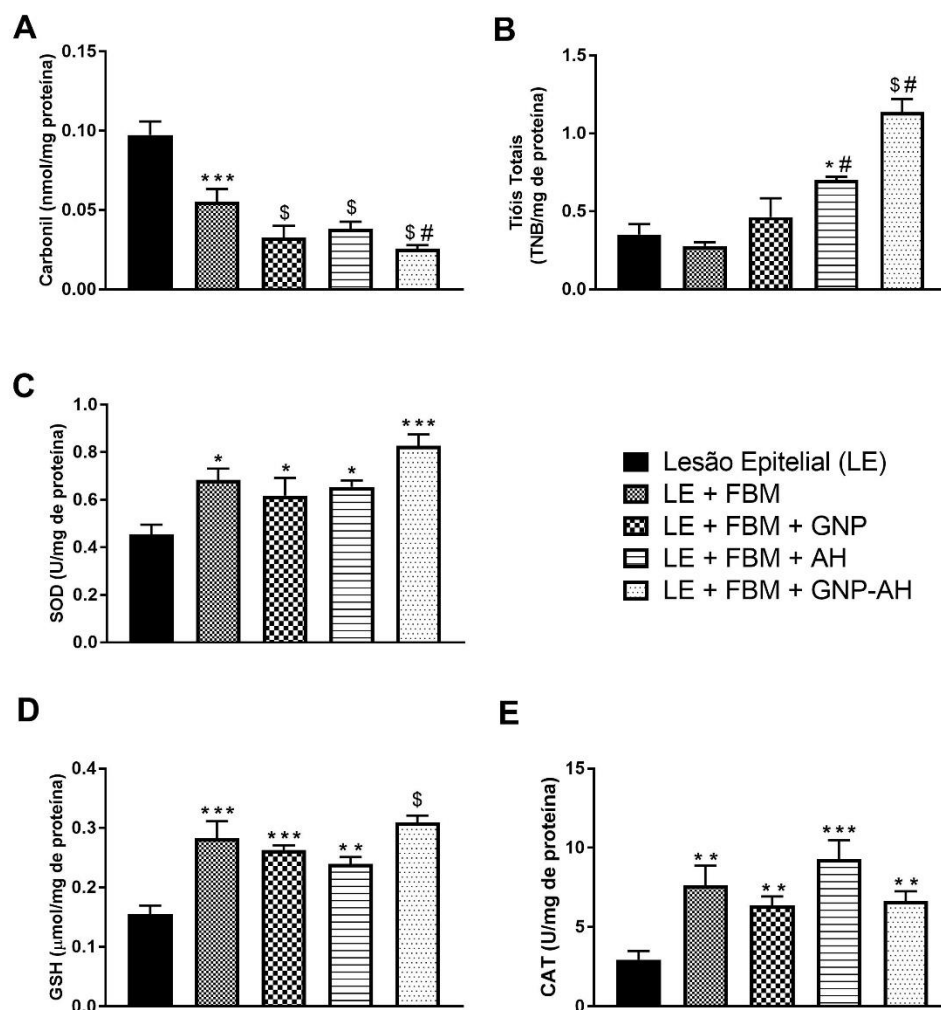


**Figura 8:** Efeitos do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados às GNP sobre os níveis de MPO (A), DCF (B) e Nitrito (C). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

#### 4.4 Marcadores de dano oxidativo e antioxidantes

Como marcadores de dano oxidativo foi avaliado os níveis de carbonila (figura 9 A) e conteúdo de grupamento tióis (figura 9 B). Os níveis de carbonila tiveram diminuição significativa em relação ao grupo lesão no grupo LE + FBM com valor de  $p < 0,001$  e os demais grupos diminuiram significativamente em relação com grupo LE com valor de  $p < 0,0001$ , além disso o grupo LE + FBM + GNP-AH apresentou diferença significativa comparado ao grupo LE + FBM. O consumo do grupamento tiol, no grupo LE + FBM + AH foi maior quando comparado ao grupo LE ( $p < 0,05$ ) e quando comparado ao grupo LE + FBM, o mesmo aconteceu com o grupo terapia combinada (LE + FBM + GNP-AH) que apresentou um aumento significativo comparado ao grupo LE ( $p < 0,0001$ ) e ao grupo LE + FBM.

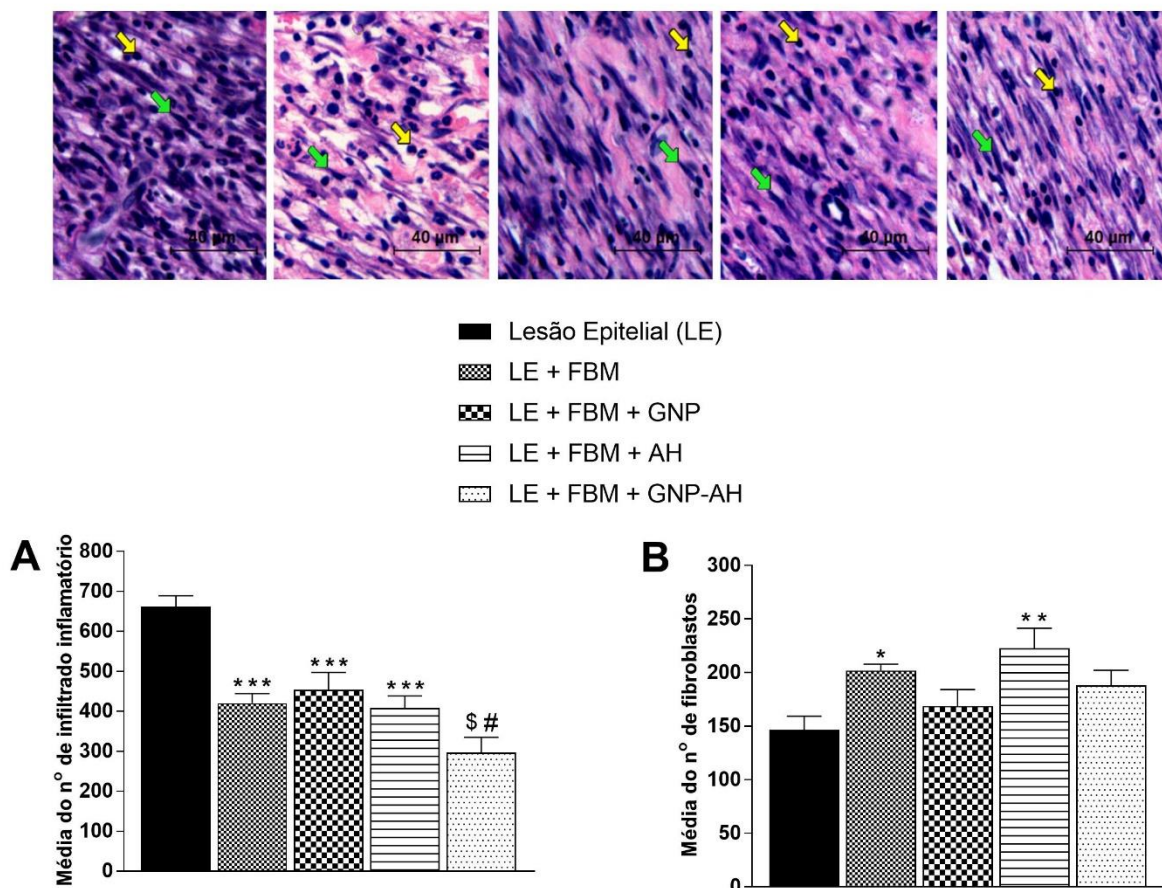
A defesa antioxidante foi medida através dos níveis de superóxido dismutase, glutationa reduzida e catalase. Os níveis de SOD (figura 9 C) foram maiores em todos os grupos tratados comparados ao grupo LE ( $p < 0,05$ ), porém o grupo LE + FBM + GNP-AH obteve uma diferença com valor de  $p < 0,001$ . O mesmo aconteceu em relação aos níveis de GSH (figura 9 D) em que os grupos LE + FBM e LE + FBM + GNP aumentaram significativamente comparados ao grupo LE ( $p < 0,001$ ). O grupo LE + FBM + AH aumentou significativamente em relação ao grupo LE com valor de  $p < 0,001$ , e o grupo LE + FBM + GNP-AH com valor de  $p < 0,0001$ . Sobre a atividade da catalase (figura 8 E) os grupos LE + FBM, LE + FBM + GNP e LE + FBM + GNP-AH demonstraram uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) e o grupo LE + FBM + AH também apresentou uma diminuição ( $p < 0,001$ ) comparada ao grupo LE.



**Figura 9:** Efeitos do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNP sobre marcadores de dano oxidativo: Carbonil (A) e Sulfidril (B) e de defesa antioxidante: SOD (C), GSH (D) e CAT (E). Os dados são apresentados em Média ± EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

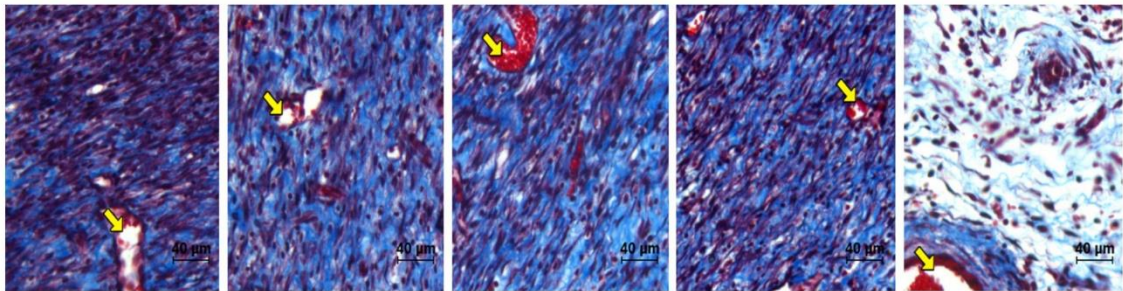
## 4.5 Análise histológica

Na figura 10 podemos observar imagens representativas de cortes histológicos da pele. Através das imagens histológicas foram feitas quantificações da média do número de leucócitos (10 A) e da média de número de fibroblastos (10 B). Pode-se observar que os grupos LE + FBM; LE + FBM + GNP e LE + FBM + AH tiveram sua média do número de leucócito diminuído quando comparado ao grupo LE ( $p < 0,001$ ) e o último grupo (LE + FBM + GNP-AH) demonstrou uma diferença significativa maior valor de  $p < 0,0001$  e também foi significativamente diferente do grupo LE + FBM. Quando observamos a média do número de fibroblastos observamos que grupo LE + FBM teve um aumento comparado ao grupo LE ( $p < 0,05$ ), assim como grupo LE + FBM + AH ( $p < 0,01$ ).

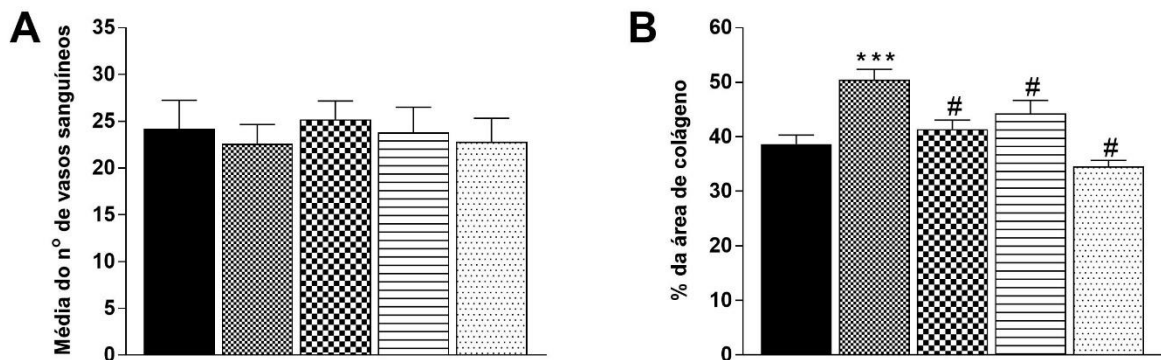


**Figura 10:** Imagens representativas de cortes histológicos da pele corados com (H&E) avaliando o efeito do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNP's sobre o número de infiltrado inflamatório, representado nas setas amarelas (A) e número de fibroblastos, representado nas setas verdes (B). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Na figura 11 foi quantificado os vasos sanguíneos (11 A) no tecido epitelial e podemos observar que não ocorreu diferença significativa em nenhum grupo. Já em relação a produção de colágeno o grupo LE + FBM apresentou diferença significativa em relação a todos os grupos.



- Lesão Epitelial (LE)
- ▨ LE + FBM
- ▩ LE + FBM + GNP
- ▧ LE + FBM + AH
- ▦ LE + FBM + GNP-AH



**Figura 11:** Imagens representativas de cortes histológicos da pele corados com (H&E) avaliando o efeito do tratamento com FBM, Ácido Hialurônico associados as GNPs sobre o número de vasos sanguíneos, representado nas setas amarelas (A) e porcentagem da área de colágeno (B). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo lesão epitelial (LE); \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo LE; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo LE; \$ $p < 0,0001$  v.s Grupo LE e # $p < 0,05$  v.s Grupo LE + FBM (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

## 5. DISCUSSÃO

Cada vez mais busca-se formas de acelerar o processo de cicatrização quando se trata de uma ferida de caráter crônico, pois a partir do processo de reparo são reduzidos a ocorrência de comorbidades (como infecções) e os custos à saúde (Guo et al., 2010). Na prática clínica, o laser de baixa potência como agente fotobiomodulador vem sendo empregado como recurso importante devido à sua capacidade de induzir redução de edema, aceleração do processo inflamatório, aumento da síntese de colágeno e da epitelização (Karu, 1999, 2004, 2010; Wong-Riley et al., 2005; Chen et al., 2011; Yaday et al., 2018).

Assim como o LBP, o ácido hialurônico mostra-se um aliado no processo de cicatrização tecidual, pois gera estimulação do metabolismo de fibroblastos e síntese dos componentes da MEC (Lopez et al., 2016). Bem como estimulando o desenvolvimento de fibrina, a atividade fagocitária, a mobilidade dos neutrófilos e dos macrófagos e a liberação de fatores quimiotáticos (migração) para os fibroblastos (Anderson, 2001). Além destes recursos, as GNPs vêm apresentando um papel importante na cicatrização de feridas (Li et al., 2015), através de aumentos significativos na expressão de colágeno, no fator de crescimento endotelial vascular, desta forma contribuindo para o fechamento da ferida (Kim et al., 2015).

Devido aos pressupostos, em nosso trabalho analisamos o efeito do uso do laser associado ao AH e GNPs sobre o processo de reparo tecidual em um modelo animal de ferida. O uso das nanopartículas no tratamento de feridas deve-se às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, capazes de auxiliar no processo de reparo tecidual. Estudo realizado por Tsai et al. (2007) afirma que as GNPs, além de proverem diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, apresentam a capacidade de inibir a migração e proliferação celular, controlando dessa maneira a exacerbação do processo inflamatório e acelerando a cicatrização da ferida.

Como parâmetros inflamatórios, foram dosadas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , expressas nas figuras 6 A e 6 B. De acordo com Khodr et al., (2001), após ruptura aguda da barreira epidérmica, ocorre aumento na expressão de IL-1 e TNF- $\alpha$  os quais são potentes mitógenos epiteliais e estimuladores da síntese de lipídios. Essas citocinas parecem ser fundamentais para o reparo da barreira cutânea.



No entanto, se a produção destas citocinas for constante o processo inflamatório será mantido e prejudicial à proliferação epidérmica (Proksch; Brandner; Jensen, 2008).

Nossos resultados demonstram que todos os grupos tratados tiveram níveis diminuídos de citocinas pró-inflamatórias, comparados ao grupo lesão. Esses resultados já foram demonstrados em outros estudos, como o realizado por Zhevago e Samoilova (2006) e Fukuda et al. (2013), e ratificam os efeitos anti-inflamatórios da FBM. Dohnert et al. (2012 e 2015); Victor et al. (2012); Silveira et al., (2014), demonstraram diminuição da resposta inflamatória e melhora na morfologia tecidual com GNPs associadas ao uso do ultrassom terapêutico e microcorrente em modelos de lesões musculares, epiteliais e tendinosas, respectivamente.

A ação anti-inflamatória das GNPs foi demonstrada pela primeira vez no trabalho de Sumbayev et al. (2013), em que as nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato diminuíram de maneira dependente do tamanho, a resposta celular induzida por IL-1- $\beta$  *in vitro* e *in vivo*. O estudo mostrou que o efeito anti-inflamatório das nanopartículas de ouro está associado com sua capacidade de interagir fisicamente com a IL-1 $\beta$  extracelular e dessa forma neutralizar a ligação com seu receptor de membrana inibindo sua cascata de sinalização e desta forma impedindo a amplificação da resposta inflamatória. Jeong et al., (2003) e Lai et al., (2016); Gul et al., (2018) mostraram que as GNPs bloqueiam a ativação do NF- $\kappa$ B ao interagir com o componente cys-179 resíduo de IKK- $\beta$  e, com isso, reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Em um modelo animal de artrite, Tsai et al. (2007), observou inibição da proliferação e migração celular, da infiltração de macrófagos e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  como benefícios do uso de nanopartículas. Conforme Hawkins e Abrahamse (2004), as citocinas estão envolvidas em todas as fases da cicatrização de feridas e regulam a migração, proliferação, diferenciação e o reparo tecidual, desempenhando um papel importante como mediadores das respostas inflamatórias, atuando na ativação de células específicas e acelerando ou modulando os processos de inflamação (Schroder et al., 2006; Hrabak et al., 2008).

A IL-4, uma citocina anti-inflamatória envolvida na cicatrização de feridas (Minciulo et al., 2016), funcionalmente, conhecida por regular a proliferação celular, a apoptose e a expressão de numerosos genes em vários tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos e fibroblastos, bem como células epiteliais e endoteliais (Luzina et al., 2012; Serezani et al., 2017). Serezani et al. (2017) sugere que essa citocina induz alterações na expressão de genes em queratinócitos que resultam em

reepitelização de feridas *in vitro* e *in vivo*. IL-10, outra citocina antiinflamatória é capaz de reduzir a produção de macrófagos intermediários de óxido nítrico e de oxigênio reativo, além de reduzir a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (Gao, 2012), desta forma também impedindo a amplificação da resposta inflamatória.

Em nosso estudo os níveis de IL-4 e IL10 (figuras 6 C e D) aumentaram no grupo LE + FBM + GNP-AH de forma concomitante à redução das citocinas pró-inflamatórias, o que demonstra o potencial terapêutico das terapias propostas em controlar a fase inflamatória e acelerar o processo de cicatrização. Conforme Zhang (2014), IL-4 e IL-10 apresentam importante papel na fase tardia da inflamação, por inibirem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) através da redução da ativação de macrófagos. Além disso, conforme Opal e DePaolo (2000), as estas citocinas são também responsáveis por parte da proliferação e diferenciação celular. Nossos achados corroboram com os de Karlas et al. (2015) em que o uso do laser de baixa potência gerou redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, favorecendo a cicatrização de feridas expostas em humanos.

Após lesão da pele, a barreira epidérmica é rompida e os queratinócitos liberam IL-1. A IL-1 é o primeiro sinal de alerta às células vizinhas para causar danos na barreira (Kupper et al., 1986; Murphy et al., 1989; Bochner et al., 1990; Freedberg et al., 2001). Componentes do sangue são liberados no local da ferida, formando um coágulo que induz hemostasia e fornece uma matriz para o influxo de células inflamatórias. As plaquetas degranulam liberando grânulos alfa, que secretam fatores de crescimento como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Com a ajuda do TGF- $\beta$ , os monócitos são convertidos em macrófagos, que desempenham um papel importante no aumento da resposta inflamatória e no desbridamento tecidual. Os macrófagos iniciam o desenvolvimento do tecido de granulação e liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e o FGF (Hantash et al., 2008).

Nesse trabalho, os níveis de fatores de crescimento estão apresentados na figura 7. No grupo LE + FBM + GNP-AH os níveis de TGF- $\beta$  foram maiores comparados aos grupos lesão e lesão + laser. De acordo com Hantash et al. (2008) o TGF- $\beta$  permite a infiltração de fibroblastos e também inicia alterações fenotípicas nessas células, transformando fibroblastos em miofibroblastos, os quais se alinham

ao longo das bordas da MEC para gerar uma força constritiva, facilitando o fechamento da ferida. Além disso, estudos *in vitro* mostram que o TGF- $\beta$  ajuda a iniciar a formação de tecido de granulação aumentando a expressão de genes associados à formação de MEC, incluindo fibronectina, o receptor de fibronectina e inibidores de colágeno e protease (Greenwel et al., 1997), estando também envolvido na regulação positiva do fator de crescimento angiogênico VEGF (White et al., 2000; Goldberg et al., 2007). Estudos, como o de Merwin et al. (1991); Tyrone et al. (2000) e Meckmongkol et al. (2007) mostraram que o TGF- $\beta$  desempenha um papel importante na contração da ferida, facilitando a contração de fibroblastos da matriz de colágeno, estimulando a migração de queratonócitos e sendo considerado potente estimulante da neovascularização e do rearranjo vascular (Merwin et al., 1991).

A análise do FGF aponta aumento em todos os grupos tratados, no entanto, nos grupos LE + FBM + GNP e LE + FBM + GNP-AH esse aumento foi maior. Nossos resultados indicam que a associação de todas as terapias é capaz de prover aceleração da fase inflamatória e do reparo tecidual e estimular a produção destes dois fatores de crescimento. Segundo Fukuda et al. (2013) e Mokoena et al. (2018), a FBM é capaz de promover diminuição de secreção de citocinas pró-inflamatórias e por consequência promover o aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, marcando assim a mudança para a fase crônica da cicatrização. Além disso, o uso da FBM leva ao aumento da atividade da adenosina trifosfato (ATP) nas células inflamatórias presentes no local da lesão, devido a estimulação da cadeia respiratória mitocondrial (Silva, 2011; Dourado, 2011; Dos Reis, 2014).

Tecidos que apresentam lesão conseqüentemente apresentarão distúrbios de ATP que é produzido através das mitocôndrias, organelas intracelulares que desempenham um papel crucial na cicatrização de feridas, caracterizando-se como a principal fonte de energia para a célula (Boekema et al., 2007). Pesquisas prévias demonstraram que a fase inflamatória é acelerada pela ação do FBM devido ao aumento na produção de ATP mitocondrial (Silveira et al., 2007; Silveira et al., 2009; Silveira et al., 2011; Silveira et al., 2013), sugerindo assim a disposição de níveis maiores de energia para as células.

Em nosso trabalho, os grupos com uso associado às GNPs obtiveram melhores resultados nos níveis de FGF, o que nos demonstra que as nanopartículas podem ser consideradas importante veículo capaz de potencializar a ação ou a entrega do AH à ferida. Li et al. (2015) e Volkova et al. (2016) demonstraram que as

GNPs além do potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano, apresentam capacidade angiogênicas capazes de aumentar a proliferação de fibroblastos e diminuir a apoptose celular no processo de cicatrização de feridas. Estudo desenvolvido por Lau et al. (2017) corrobora com nossos resultados e defende que a associação do FBM e a GNPs gera maior efeito de contração da ferida do que a utilização isolada de cada terapia, isso porque a associação de ambas as técnicas promove a cicatrização de feridas decorrente do encurtamento da fase inflamatória, promoção da angiogênese e da produção de colágeno.

Além disso, já foi evidenciado que o AH também possui a capacidade de acelerar o processo de cicatrização (Anderson, 2001) e ativar respostas específicas em todas as células envolvidas no processo de cicatrização; em particular, a proliferação de fibroblastos e a angiogênese (Prosdocimi e Bevilacqua, 2012). Este aumento na proliferação de fibroblastos está associado a capacidade do AH de aumentar a expressão de fatores de crescimento como TGF e FGF. No estudo de Zhao et al. (2013) e Shimizu et al. (2014) o HA facilitou a reepitelização, levou à formação de tecido mole com boa elasticidade e aumentou a densidade microvascular. AH também mostrou resultados promissores para o reparo do tecido conjuntivo em termos de reparação de tendões e cartilagens em dois modelos de coelho (Oryan et al., 2012 e Tuncay et al., 2013).

A resposta inflamatória é acompanhada de extensa fagocitose e aumento do consumo de oxigênio, favorecendo à formação de espécies reativas de oxigênio. A enzima mieloperoxidase (MPO), presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, tem papel fundamental na produção destas espécies reativas de oxigênio (ERO). Em fagócitos, estas EROs podem participar tanto do processo de morte de patógenos, quanto da sinalização de eventos da inflamação (Cruz, 2010). Neste trabalho, utilizamos a MPO como um marcador inflamatório (figura 8 A). Nossos resultados demonstram que todos os grupos tratados tiveram níveis diminuídos deste marcador comparados com o grupo sem tratamento, o que ratifica a ação anti-inflamatória das terapias propostas.

Gonçalves et al. (2013) sugerem que a fotobiomodulação exerce seus efeitos, especialmente nas fases iniciais do processo de reparo de tecidos. Relatam ainda que o FBM é capaz de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por reduzir o estresse oxidativo e a atividade da célula inflamatória e/ou estimular o sistema antioxidante. A eficácia do laser sobre a formação de ERO e ERN

foram também documentados em estudos propostos por Servetto, Cremonuzzi et al., (2010); Dalmarco et al., (2012); Laraia, Silva et al., (2012); e Wu, Chen et al., (2013).

Além da ação do laser, os efeitos antioxidantes da GNP já são bem elucidados na literatura, corroborando com nossos achados. O estudo realizado por Silveira e Carvalho (2017), aponta as GNPs como um promissor tratamento de condições inflamatórias agudas sendo eficazes na diminuição de EROs. Estudos revelam o papel efetivo das GNPs como um agente antioxidante, por inibir a formação de ERO, agir como sequestrador de radicais livres, melhorando assim a ação de enzimas antioxidantes (Barathmanikanth et al., 2010; Sul et al., 2010). O estudo de Kajita et al. (2007), mostra a relação direta das GNPs com os radicais livres, mostrando que as GNPs estão associadas na eliminação de radicais livres, ou na interrupção da vida desses radicais, como o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, independente da dose. Nossos resultados demonstram níveis reduzidos do oxidante DCF (figura 8 B) no grupo LE + FBM + GNP-AH comparados ao grupo lesão. Resposta semelhante foi obtida na análise dos níveis de NO.

Os marcadores de dano oxidativo nesse trabalho foram analisados através dos níveis de carbonil (figura 9 A) e do grupamento tiol (figura 9 B), os quais foram compatíveis com os resultados de ROS. Nos grupos tratados a diminuição do dano quando visto através da carbonilação de proteínas diminuiu significativamente comparada ao grupo lesão. Os benefícios da terapia podem ser vistos nos níveis de sulfidril, que se mostram aumentados nos grupos tratados com FBM e AH e no grupo terapia combinada com FBM, GNP e AH, indicando redução dos danos aos grupamentos tióis. Corroborando com nossos achados, Victor et al. (2012) encontraram menor dano lipídico e proteico realizando aplicação do LBP com GNPs em modelo animal de lesão muscular traumática.

Na ocorrência de danos oxidativos ou aumento excessivo de oxidantes, o organismo utiliza a atividade de enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa. Nossos resultados demonstram aumento nos níveis de SOD (figura 9 C) em todos os grupos tratados, assim como aumento nos níveis de GSH (figura 9 D) demonstrando efetividade dos tratamentos em preservar os grupamentos tióis da célula. Mesmos resultados foram encontrados nos níveis de catalase (figura 9 E), os quais aumentaram nos grupos tratados.

Nossos achados vão ao encontro dos de Sousa Filho et al. (2018) que investigaram os efeitos do laser de baixa potência com um bioflavonóide (diosmina)

em um modelo de lesão muscular traumática. Neste estudo, os autores concluíram que a associação do FBM com dismiosina reduz os níveis de peroxidação lipídica (dano celular em membrana) e promove aumento do sistema de defesa antioxidante medido através da atividade das enzimas SOD e CAT. Outros estudos, como os de Silveira et al. (2011 e 2016); demonstraram que a FBM é capaz de aumentar os níveis de SOD, CAT e GSH em lesões musculares traumáticas e em cicatrização de feridas.

De acordo com Rattanata et al. (2015) as GNPs exibem altas atividades catalíticas de reações de eliminação de radicais livres, sendo também capazes de aumentar os níveis de NRF2, fator que induz a sinalização de genes antioxidantes. Este aumento é causado por ação das GNPs que afetam as ligações tióis de Keap1, e assim, mudam sua conformação, liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo como um agente antioxidante (Cheng et al., 2015; Wang et al., 2017). O potencial antioxidante do AH foi apresentado no estudo realizado por Foschi et al. (1990), expresso por melhora significativa no processo de cicatrização de feridas em ratos submetidos a um aumento na geração de radicais livres de oxigênio.

A fim de melhor elucidar nossos resultados, foi realizada a análise histológica dos tecidos. A figura 10 A nos permite observar menor infiltrado inflamatório em todos os grupos tratados e maior expressão de fibroblastos (figura 10 B) nos grupos tratados com laser e ácido hialurônico. Trabalho realizado por Hussein et al., (2011) com objetivo de acelerar e favorecer a cicatrização de feridas e reduzir a formação de cicatriz, o grupo tratado com FBM gerou infiltração aumentada de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, com proliferação de fibroblastos e presença de tecidos conectivos fibrosos.

Em relação ao efeito das terapias sobre este processo, o AH é considerado uma substância endógena cuja concentração aumenta durante o processo de reparo da ferida. Fibroblastos, células endoteliais e macrófagos são atores-chave no processo de reparo tecidual e uma ativação combinada de funções específicas dessas células pode melhorar substancialmente o processo de fechamento da ferida (Tammi et al., 2002; Yang et al., 2010; Galeano et al., 2011). Segundo Hempfling et al. (2016) o AH possui capacidade de reduzir a permeabilidade vascular, inibir a migração de PMN (leucócitos e macrófagos) e a fagocitose. O hialuronano, assim como seus produtos de degradação que são gerados nas feridas, são capazes de ativar respostas específicas em todas as células envolvidas no processo; em particular, a

proliferação de fibroblastos e a formação de novos vasos foram extensivamente estudadas (Prosdocimi et al., 2012). O uso da FBM frente às alterações histológicas já foi investigado. No estudo de Lau et al. (2017) os ratos submetidos a tratamento com GNP e FBM apresentaram um fechamento significativamente acelerado da ferida em comparação com outros grupos e os resultados histológicos indicam maior número de vasos nos grupos tratados. Apesar dos estudos expostos, em nosso trabalho não encontramos diferença significativa na formação de novos vasos entre os grupos.

Com resultado diferente, a análise da porcentagem de área com de produção de colágeno, permite observar que apenas o grupo tratado com laser teve um aumento dessas áreas em relação ao grupo lesão. No entanto, o mecanismo pelo qual o laser estimula a produção de colágeno e os parâmetros utilizados para acelerar o reparo ainda não estão bem esclarecidos. Segundo Pugliese et al. (2003) o laser induz a produção de fibras de colágeno e elastina a partir do aumento da síntese de pró-colágenos em culturas de fibroblastos humanos; e isto deve-se ao fato de interagir de maneira eficiente com vários elementos da matriz extracelular, como por exemplo o AH.

Como parâmetros de avaliação para contração da ferida, utilizamos a borda da lesão como referência e mensuramos a área total da ferida em cm<sup>2</sup> utilizando o software imagem J. Nossos resultados demonstram maior contração da ferida nos grupos LE + FBM + GNP e LE + FBM + GNP-AH. Estes achados, nos levam a acreditar que a FBM foi responsável por atuar de forma importante na redução da área através de seus efeitos bioestimulatório no processo de cicatrização. Dados semelhantes foram reportados por Silveira et al. (2007) em que o LBP auxiliou na cicatrização e redução do tamanho da ferida 3 e 10 dias após a indução da lesão epitelial. Fundamentando nossos resultados, Gonçalves et al. (2013) sugerem que a fotobiomodulação exerce seus efeitos, especialmente nas fases iniciais do processo de reparo de tecidos.

Ao analisar nossos resultados, pode ser observado que todas as propostas terapêuticas foram capazes de favorecer o processo de cicatrização tecidual. No entanto melhores resultados foram encontrados no grupo submetido a associação de todas as terapias. Estes melhor efeito obtido no grupo LE + FBM + GNP-AH parece ser dependente dos efeitos somados das terapias em associação em que as GNPs, atuam como importante recurso de controle do processo inflamatório (Selim, Elhakim e Ayadhi, 2014, Lai et al., 2016, Kalimuthu et al., 2018, Taratummarat et al., 2018;

Carvalho et al., 2018), e como moléculas carreadora de drogas (Kalimuthu et al., 2018), em que supõem-se que quando ligada ao AH, provê o transporte dessa substância às células, potencializando seus efeitos.



## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados permitem concluir que todas as terapias favoreceram o processo de reparo tecidual. No entanto, podemos concluir que o grupo em que foi associado todas as terapias, obteve maior evidência de redução da resposta inflamatória permitindo transição para a fase crônica de maneira mais precoce, estimulando o reparo tecidual. Observou-se então, que a combinação do FBM + GNPs-AH otimizou a secreção de citocinas anti-inflamatórias, fatores de crescimento de proliferação e diferenciação celular, tornando-se assim uma nova modalidade com potencial terapêutico eficaz na resolução das feridas cutâneas e na prevenção de comorbidades.

Contudo, mais estudos podem ser realizados com o intuito de analisar a funcionalidade e resistência mecânica do novo tecido formado, de forma a avaliar de maneira mais abrangente a eficácia dessas terapias.

## REFERÊNCIAS

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2):141-145.

Akturk O, Kismet K, Yasti AC, Kuru S, Duymus ME, Kaya F, Keskin D. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: a potential skin wound healing biomaterial. *Journal of biomaterials applications.* 2016; 31(2): 283-301.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33: 183–4.

Anderson, I. The properties of hyaluronan and its role in wound healing. *Professional Nurse.* 2001; 17(4): 232–235.

Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Effects of low-level laser therapy on wound healing. *Rev Col Bras Cir.* 2014; 41(2): 129-133.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990;61(7): 1303–13.

Assis L, Tim C, Magri A, Fernandes KR, Vassão PG, Renno ACM. Interleukin-10 and collagen type II immunoexpression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in an experimental model of osteoarthritis. *Lasers in Medical Science.* 2018; 33(9): 1875-1882.

Balasubramanian SK; Yang L; Yung LL; Ong C; Ong W; Yu L. E; *Biomaterials.* 2010; 31: 9023.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 2006; 32:279-312.

Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP, Pinto Júnior DDOS S, Ferrari RA. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(1):11-7.

Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of Nanobiotechnology.* 2010; 8: 16.

Baratto L, Calzà L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, Lorenzini L, Traverso S. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(1):103-12.

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2012; in press.

Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005; 31: 674-86.

- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60: 1289–1306.
- Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70:2059–2081.
- Bochner BS, Charlesworth EN, Lichtenstein LM, Derse CP, Gillis S, Dinarello CA, Schleimer RP. Interleukin-1 is released at sites of human cutaneous allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86 (6 Pt 1): 830–9.
- Boekema EJ, Braun HP, Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system, *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (1) 1–4 (5).
- bone in rat critical size defect model. *J Craniomaxillofac Surg*, 2012; 40:783-787.
- Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns*. 2010; 36(4): 450–460.
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg*. 2006; 117(7):12-34.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006; 21:177–183.
- Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomater Sci*. 2004;25(5); 843-850.
- Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PloS ONE*. 2011; 6(7):22453.
- Cheng H, Lai G, Fu L, Zhang H, Yu A. Enzymatically catalytic deposition of gold nanoparticles by glucose oxidase-functionalized gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 71, 353-358.
- Clark RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol*. 1990; 128S–134.
- Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF (ed) *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press. 1996; 3–35.
- Clarke S, Lock V, Duddy J, Sharif M, Newman JH, Kirwan JR. Intra-articular hylan GF (Synvisc®) in the management of patellofemoral osteoarthritis of the knee (POAK). *Knee*. 2005; 12(1): 57–62.

Conrozier T, Jerosch J, Beks P, Kemper F, Euller-Ziegler L, Bailleul F. Prospective, multi-centre, randomized evaluation of the safety and efficacy of five dosing regimens of viscosupplementation with hylan G-F 20 in patients with symptomatic tibio-femoral osteoarthritis: a pilot study. *ArchOrthop Trauma Surg.* 2009;129(3):417–23.

Cruz, Was. Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, U. de São Paulo, São Paulo, 2010.

Da Silva JP, Da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1):17-21.

Dai NT, Williamson MR, Khammo N, Adams EF, Coombes AG. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials.* 2004; 25(18): 4263–4271.

Dallagnol MA, Nicolau RA, De Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers MedSci.* 2009; 24: 909-16.

de Carvalho TG, Garcia VB, de Araújo AA, da Silva Gasparotto LH, Silva H, Guerra GCB, Chan AB. Spherical neutral Gold nanoparticles improve anti-inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in alcohol-methamphetamine-induced liver injury in rats. *International journal of pharmaceutics.* 2018

Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions. *Acta Biomater.* 2014; 10(4): 1558–1570.

Dohnert MB, Ferreira GK, Silveira PCL, Zanoni ET, Dohnert LH, Souza CT. Inflammatory cytokines content in Achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium in rats. *Inflammation.* 2015; 38(3):1044-9.

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:1651-7.

Dong J, Sulik KK, Chen, S. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett.* 2010; 193(1):94-100.

Dos Reis FA, da Silva BA, Laraia EM, de Melo RM, Silva PH, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(2):106-12.

Dourado DM, Fávero S, Matias R, Carvalho P T, da Cruz-Höfling MA. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(2):418-26.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; (20):4368-80.

Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007; 59:1351-1365  
Flohé L, Gunzler W. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* 1984; 105: 114-21.

Foschi D, Castoldi L, Radaelli E, Abelli P, Calderini G, Rastrelli A, Mariscotti, C.; MARAZZI M, Trabucchi E. Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats. *International Journal of Tissue Reactions.* 1990; 6: 333-339.

Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 633–40.

Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013; 28:1305–1313.

Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* (2013) 28:1305–1313.

Galeano M, Polito F, Bitto A, Irrera N, Campo GM, Avenoso A, et al. Systemic administration of high-molecular weight hyaluronan stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 752–9.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 12(4):16.

Gao, Bin. "Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 Suppl. 2012; 2: 89–93.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(11):1307-15.

Gillitzer, R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 513–521.

Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 2645–55.

Gomes LE, Dalmarco EM, André ES. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30(11):642-7.

Gonçalves RV, Novaes RD, do Carmo Cupertino M, Moraes B, Leite JPV, Peluzio MdCG. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):383–390.

Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of alpha2 (I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem.* 1997; 272:19738–45.

Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering – in vivo and in vitro applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011; 63(4–5), 352–366.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(2):619-624.

Gul A, Kunwar B, Mazhar M, Faizi S, Ahmed D, Shah MR, Simjee SU. Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF- $\kappa$ B and iNOS activation. *International immunopharmacology.* 2018; 59: 310-317.

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89(3):219–229.

Gupta S, Purcell NH, Lin A, Sen S. Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biol.* 2002; 159(6):1019-28.

Gurtner GC. Wound healing: normal and abnormal. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2007;15-22.

Hantash BM, Zhao L, Knowles JA, Lorenz HP. Adult and fetal wound healing. *Front Biosci.* 2008; 13: 51–61.

Hawkins D, Abrahamse H: The release of interleukin-6 after low level laser therapy and the effect on migration and proliferation of human skin fibroblasts. *Med Technol S Afr* 2004; (18):11–15.

Hempfling H. Intra-articular hyaluronic acid after knee arthroscopy: a two-year study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007; 15(5):537–46.

- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-226.
- Hrabák A, Bajor T, Csuka I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. *Inflamm Res.* 2008; 57 (2):75-83.
- Hussein AJ, Alfars AA, Falih MA, Hassan ANA. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *North American journal of medical sciences.* 2011; 3(4): 193.
- Jeong J, Kim J, Seok SH, Cho WH. Indium oxide (InO) nanoparticles induce progressive lung injury distinct from lung injuries by copper oxide (CuO) and nickel oxide (NiO) nanoparticles. *Archives of Toxicology.* 2015; 90: 817–28.
- Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br. J. Plast. Surg.* 2002; 55(3): 185–193.
- Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M. Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Free Rad Res.* 2007; 41:615–26
- Kalimuthu K, Lubin BC, Bazylevich A, Gellerman G, Shpilberg O, Luboshits G, Firer MA. Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. *Journal of nanobiotechnology.* 2018; 16(1), 34.
- Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2011; 54(3):97-101.
- Karlas T, Berger J, Garnov N, Lindner F, Busse H, Linder N, Wiegand, J. Estimating steatosis and fibrosis: Comparison of acoustic structure quantification with established techniques. *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2015; 21(16), 4894.
- Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010; (28):159-160.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol.* 1999; (49):1-17.
- Karu TI, Afanaseva NI, Kol'iakov SF, Piatibrat LV. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk.* 1998; 360: 267-270.
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; (3):211-16.
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(6):593-9.

Khodr, B., & Khalil, Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 30(1): 1-8.

Kim JE, Lee J, Jang M, Kwak MH, Go J, Kho EK, et al.,. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *Biomater Sci*. 2015; 3(3):509–519.

Kitchen S; Bazin S. *Eletroterapia de Clayton*. Editora Manole, São Paulo, 10<sup>a</sup> edição. 1998.

Kupper TS, Deitch EA, Baker CC, Wong WC. The human burn wound as a primary source of interleukin-1 activity. *Surgery* 1986; 100: 409–15.

Lai TH, Chung CH, Chen BH, Hung CF, Inbaraj BS, Ma MC, Wu WB. Gold nanoparticles compromise TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell adhesion molecule expression through NF- $\kappa$ B and protein degradation pathways and reduce neointima formation in a rat carotid balloon injury model. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2016; 12(12), 2185-2201.

Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, DOS Reis FA, Albertini R, DE Almeida P, Leal JUnior EC, Tarso DE, Camillo KL, DE Carvalho P. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol*. 2012; 88(6):1546-50.

Lau P, Bidin N, Islam S, Shukri WNBWM, Zakaria N, Musa N, et al.,. Influence of Gold Nanoparticles on Wound Healing Treatment in Rat Model: Photobiomodulation Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2017, 49:380–386.

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004; 18(7):816–827

Leelahavanichkul A. Gold nanoparticles attenuates bacterial sepsis in cecal ligation and puncture mouse model through the induction of M2 macrophage polarization. *BMC microbiology*. 2018; 18(1): 85.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

Li G, Feng X, Wang S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res*. 2005; 54:193–99.

Li X, Wang H, Rong H, Li W, Luo Y, Tian K, et al.,. Effect of composite SiO<sub>2</sub>@ AuNPs on wound healing: In vitro and vivo studies. *J Colloid Interface Sci*. 2015; 445:312–319.



Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(6): 849-55.

Longinotti C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: a review. *Burn Trauma*. 2014;2(4):162-8

Lopez JF, Ruano-Ravina A. Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid in the treatment of hip osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006; 14(12): 1306-1311.

Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmolliere A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2002; 10(2):86-92.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol*. 2012; 92(4): 753–764.

Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- $\kappa$ B and IFN- $\beta$ /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*. 2010; 23(3):214–219.

Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011; 216(7):753–762.

Malam Y, Loizidou M, Seifalian, AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2009; 30(11): 592-599.

Mandelbaum SH, Santis EPD, Mandelbaum, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *AnbrasDermato*. 2003; 78(4): 393-410.

Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGF $\beta$ -dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360: 709–14.

Medeiros JL, Nicolau RA, Nicola EM, Santos JN, Pinheiro AL. Healing of Surgical Wounds Made with lambda970-nm Diode Laser Associated or Not with Laser Phototherapy (lambda 655 nm) or Polarized Light (lambda 400-2000 nm). *Photomed Laser Surg*. 2010; 28: 489-96.

Merwin JR, Roberts A, Kondaiah P, Tucker A, Madri J. Vascular cell responses to TGF- $\beta$  3 mimic those of TGF $\beta$  1 in vitro. *Growth Factors*. 1991; 5: 149–58.

Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA JR, DA Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3):335-40.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971; 122: 532-535.

Metcalfe AD, Ferguson MW. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials.* 2007; 28(34): 5100–5113.

Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, ET AL., Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2016; 64 (2) 111–126.

Mokoena D, Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H. Role of photobiomodulation on the activation of the smad pathway via TGF- $\beta$  in wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2018: 189; 138-144.

Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research.* 2005; 11: 3530–3534.

Murphy GM, Dowd PM, Hudspeth BN, Brostoff J, Greaves MW. Local increase in interleukin-1-like activity following UVB irradiation of human skin in vivo. *Photodermatol* 1989; 6: 268–74.

Nawrat P, Surazynski A, Karna E, Pałka JA. The effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of collagen metabolism in cultured human skin fibroblasts. *Pharmacol Res.* 2005; 51(5):473–477

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *VeterinariMedicina.* 2008; 53: (8) 397–411.

Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sánchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2015; 18(1):53-60.

Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DW. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *The Journal of clinical investigation.* 1993; 91(6): 2368-2377.

Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NH, Artalheiro PP, Albertini R, Bussadori SK, Fernandes KP. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2011.

Opal SM, Depalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117(4), 1162-1172.

Oryan A, Moshiri A, Meimandi Parizi AH, RaayatJahromi A. Repeated administration of exogenous Sodium-hyaluronate improved tendon healing in an in vivo transection model. *J Tissue Viability*. 2012; 21: 88-102.

Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004; 187:11-6.

Pavelka K, Uebelhart D. Efficacy evaluation of highly purified intra-articular hyaluronic acid (Sinovial) hylan G-F20 (Synvisc) in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis. A double-blind, controlled, randomized, parallel-group non-inferiority study. *Osteoarthritis Cartil*. 2011; 19 (11):1294–300.

Pereira RF, Barrias CC, Granja PL, and Bartolo PJ: Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine*. 2013; 8: 603.

Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Ja JR, Aimbire F, Albertini r. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011; 26(1):85-94.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17: 307–313.

Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(1):1-10.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008; (17):1063-72.

Prosdocimi M, Bevilacqua C. Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Medica*. 2012; 54(2): 129-135.

Rattanata N, Daduang S, Wongwattanakul M, Leelayuwat C, Limpiboon T, Lekphrom R, Daduang J. Gold Nanoparticles Enhance the Anticancer Activity of Gallic Acid against Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015; 16(16), 7143-7147.

Rooney P, Wang M, Kumar P, Kumar S. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *Journal of cell science*. 1993; 105(1): 213-218.

Salwowska NM, Bebenek KA, Zadlo DA, Wcislo-Dziadecka DL. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *J Cosmet Dermatol*. 2016; 15(4):520-526.

Santana-Blank L, Rodríguez-Santana E, Santana-Rodríguez K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(1):41-52.

Schroder AK, Ohe M, Kolling U, Alstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D et al. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology*. 2006; 119(3):317-27.

Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen*. 2011; 19(2):134–148.

Selim ME, Abd-Elhakim YM, Al-Ayadhi LY. Pancreatic response to gold nanoparticles includes decrease of oxidative stress and inflammation in autistic diabetic model. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015; 35(2), 586-600.

Sengupta M, Banerjee P, Paul S, Sengupta J, Ghosh M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. *Muller J MedSci Res*. 2015; 6: 27-30.

Serezani AP, Bozdogan G, Sehra S, Walsh D, Krishnamurthy P, Sierra Potchanant E et al.,. IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 139: 142–151.

Servetto N, Cremonuzzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA et al.,. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med*. 2010; 42(6):577–83.

Shaw TJ, Martin, P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci*. 2009; 22(18): 3209–3213.

Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol*. 2001; 187(1):73-80.

Shimizu N, Ishida D, Yamamoto A, Kuroyanagi M, Kuroyanagi Y. Development of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing bioactive components: evaluation of wound healing potential in animal tests. *J Biomater Sci Polym*. 2014; 25:1278-1291.

Shukla R, Bansal B, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir* 21. 2005; 10644–10654.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci*. 2011, in press.

Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 95(2):89-92.

Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011; (26):125-31.

Silveira PC, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater Sci Eng C.* 2014; 44: 380–385.

Silveira PCL, Carvalho FMV. Efeitos do Tratamento com Nanopartículas de Ouro em Modelo de Inflamação Pulmonar Aguda Induzida por Lipopolissacarídeo. (Dissertação). Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde – PPGCS. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. 2017.

Silveira PCL, da Silva LA, Pinho CA, De Souza PS, Ronsani MM, Scheffer Dda L, Pinho RA. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):431-6.

Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 86, 2007: 279–282.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341(10):738–746.

Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen.* 2006; 14: 457–62.

Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Kim YY, Kim SH, Kim JS, Choi HS. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2010; 74(11): 2209-13.

Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, Calzolari L. Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 $\beta$ -Induced Pro-Inflammatory Responses. *Small.* 2013; 9(3):472-477.

Supp DM, Boyce ST. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin. Dermatol.* 2005; 23(4): 403–412.

Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4):323-8.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002; 277: 4581–4.

Tammi RH, Tammi MI. Hyaluronan in the epidermis and other epithelial tissues. In: Garg, H.G., Hales, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan.* 2004.

Taratummarat S, Sangphech N, Vu CTB, Palaga T, Ondee T, Surawut S, Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(2):544-54.

Tuncay I, Erkocak OF, Acar MA, Toy H. The effect of hyaluronan combined with microfracture on the treatment of chondral defects: an experimental study in a rabbit model. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology.* 2013; 23(7): 753-758.

Tunér J, Hode L. Low-level laser therapy for hand arthritis—fact or fiction? *Clin Rheumatol.* 2010; 29(9): 1075-6.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951; 11:55-75.

Tyrone JW, Marcus JR, Bonomo SR, Mogford JE, Xia Y, Mustoe TA. Transforming growth factor beta3 promotes fascial wound healing in a new animal model. *Arch Surg.* 2000; 135: 1154–9.

Van WW. The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124:369

Victor EG, Silveira PC, Possato JC, Rosa GL, Munari UB, Souza CT, Paula MM. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology.* 2012; 10(1): 11.

Vinha PP, Junior AAJ, Junior JAF, Vannucchi H, Marchini JS, Cunha SFC. Estresse inflamatório e oxidativo após cirurgia para correção de pequenas áreas de seqüela de queimaduras 2011; *Acta Cir. Bras.* 26 (4).

Volkova N, Yukhta M, Pavlovich O, Goltsev A. Application of cryopreserved fibroblast culture with Au nanoparticles to treat burns. *Nanosc Res Lett.* 2016; 11(1):1–6.

Wang X, Xu R, Sun X, Wang Y, Ren X, Du B, Wei Q. Using reduced graphene oxide-CdSe nanocomposite to enhance photoelectrochemical activity of gold nanoparticles functionalized tungsten oxide for highly sensitive prostate specific antigen detection. *Biosensors and Bioelectronics.* 2017; 96: 239-245.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83:835-70.

White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259–68.

Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005; 280(6):4761-71

Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang YH. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One*. 2013; 30(11):642-7

Yadav A, Verma S, Keshri GK, Gupta A. Combination of medicinal honey and 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation promotes healing and impedes inflammation, pain in full-thickness burn. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018; 186: 152-159.

Yang G, Espandar L, Mamalis N, Prestwich GD. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. *Vet Ophthalmol* 2010; 13: 144–50.

Ye Y, Zhou X, Mao S, Zhang J, Lin B. Platelet rich plasma versus hyaluronic acid in patients with hip osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal Of Surgery*. 2018; 53: 279-287.

Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol*. 2012; 30(12): 638–648.

Yu W, Naim JO, MCGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *PhotochemPhotobiol*. 1997; (66):866-71.

Zanchetta P, Lagarde N, Uguen A, Marcorelles P. Mixture of hyaluronic acid, chondroitin 6 sulphate and dermatan sulphate used to completely regenerate

Zhang Q, Iwakuma N, Sharma P, Moudgil BM, Wu C, McNeill J, Grobmyer SR. Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography. *Nanotechnology*. 2009; 20 (39): 395 -102.

Zhao JY, Chai JK, Song HF, Zhang J, Xu MH, Liang YD. Influence of hyaluronic acid on wound healing using composite porcine acellular dermal matrix grafts and autologous skin in rabbits. *Int Wound J*. 2013; 10:562-572.

Zhevago NA, Samoilova KA. Pro- and anti-inflammatory cytokine content in human peripheral blood alter its transcutaneous (in vivo) and direct (in vitro) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg* 2006: G 24(2):129–39.

**ANEXO**



## ANEXO 1 – Certificado do CEUA

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **13/03/2018**.

<b>Título do projeto</b>	Efeitos da associação entre o laser de baixa potência (LBP) e o ácido hialurônico (AH) ligado a nanopartículas de ouro em modelo de lesão epitelial.
<b>Project title</b>	Effects of the association between low-power laser (LBP) and hyaluronic acid (AH) connected to gold nanoparticles (AH-GNPs) in epithelial injury model.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	027/2018-1 – Versão 01
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Paulo Cesar Lock Silveira
<b>Pesquisadores Researchers</b>	FERNANDO MILANEZ DIAS, DANIELA PACHECO DOS SANTOS HAUPENTHAL, CAROLINI MENDES, MATHEUS RODRIGUES, GUSTAVO DE BEM SILVEIRA, RUBYA PEREIRA ZACCARON, MARIA EDUARDA ANASTÁCIO, LAURA CASAGRANDE.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/04/2018 a 28/11/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Wistar
Nº de animais	50
Idade/Peso	60 dias / 250-300g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 13 de março de 2018.

**Samira da Silva Valvassori**  
Coordenadora da CEUA

## ANEXO 2 – Termo de autorização para utilização da obra



## UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE OBRA**

Tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros

**1) DADOS DO AUTOR**1.1 Nome: Cardini Mendes1.2 CPF: 100.494.339-381.3 Vínculo com a instituição: acadêmico de pós graduação stricto sensu  
(acadêmico de pós graduação *stricto sensu*, docente, pesquisador, técnico-administrativo)**2) INFORMAÇÕES DA OBRA**2.1 Identificação da obra: Dissertação  
(tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros)2.2 Título da obra: Efeitos da associação entre a foto terapia medi-  
larada e o ácido hialurônico ligado a nanopartículas de  
ouro em um modelo de lesão epitelial

Na qualidade de titular dos direitos autorais relativos à obra acima descrita, o autor, com fundamento no artigo 29 da Lei n. 9.610/1998, autoriza a UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, a disponibilizar gratuitamente sua obra, sem ressarcimento de direitos autorais, para fins de leitura, impressão e/ou *download* pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela UNESC, nas seguintes modalidades:

a) disponibilização impressa no acervo da Biblioteca Prof. Eurico Back; b) disponibilização em meio eletrônico, em banco de dados na rede mundial de computadores, em formato especificado (PDF); c) Disponibilização pelo Programa de Comutação Bibliográfica – Comut, do IBICT (Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia), órgão do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Criciúma, 02 de junho de 2019.Assinatura: Cardini Mendes